

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ANALÝZA ŠŤÁV VYBRANÝCH ODRŮD ČERNÉHO RYBÍZU

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. LENKA KANIOVÁ

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ANALÝZA ŠŤÁV VYBRANÝCH ODRŮD ČERNÉHO RYBÍZU

ANALYSIS OF JUICES OF SELECTED BLACKCURRANT VARIETIES

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

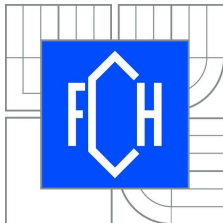
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. LENKA KANIOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

RNDr. MILENA VESPALCOVÁ, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0903/2014	Akademický rok: 2014/15
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Lenka Kaniová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce:	RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Analýza šťáv vybraných odrůd černého rybízu

Zadání diplomové práce:

Literární část:

- 1) Stručný botanický popis černého rybízu (*Ribes nigrum*), využití v potravinářství, biologicky aktivní látky rybízu
- 2) Fenolické látky, jejich vlastnosti a význam, metody stanovení
- 3) Vitamin C, jeho vlastnosti a význam, metody stanovení

Experimentální část:

- 1) Stanovení celkových fenolických látek, celkových anthokyanů a vitaminu C ve šťávách vybraných odrůd černého rybízu
- 2) Zpracování a vyhodnocení získaných dat
- 3) Srovnání šťáv studovaných zástupců černého rybízu na základě stanovených výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2015

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Lenka Kaniová
Student(ka)

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30. 1. 2015

Vytiskl(a): RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
29.04.2015 09:34

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan

ABSTRAKT

Práce se zabývá chemickou analýzou šťáv vybraných odrůd černého rybízu (*Ribes nigrum* L.).

Teoretická část je rozdělena na tři hlavní kapitoly. V první kapitole je uvedena stručná botanická charakteristika černého rybízu, obsah biologicky aktivních látek v plodech a využití plodů pro potravinářské účely. V druhé kapitole jsou podrobně rozepsány vlastnosti, význam a metody stanovení fenolických látek. V poslední kapitole je popsán vitamin C, jeho vlastnosti, význam a metody stanovení.

Experimentální část popisuje stanovení tří chemických parametrů plodů černého rybízu: obsah celkových fenolických látek, obsah celkových anthokyanů a obsah vitaminu C. Pro stanovení bylo vybráno dvanáct moderních odrůd černého rybízu. Na základě výsledků je možné poukázat na významnější odrůdy. Obsah celkových fenolických látek ve všech vzorcích se pohyboval v rozmezí 326,7–641,4 mg·100 g⁻¹. Obsah celkových anthokyanů ve všech vzorcích byl analyzován v rozmezí 102,5–284,5 mg·100 g⁻¹. A obsah vitaminu C ve všech vzorcích se nacházel v rozmezí 82,0–379,1 mg·100 g⁻¹. Celkovým porovnáním jednotlivých odrůd černých rybízů bylo zjištěno, že odrůdy Ceres, Ben Hope, Ben Lomond, Démon a Ometa jsou nejvíce perspektivními odrůdami z hlediska obsahu výše uvedených látek.

ABSTRACT

The work deals with the chemical analysis of juices selected varieties of black currant (*Ribes nigrum* L.).

The theoretical part is divided into three main chapters. In the first chapter there are short botanical characteristics of black currants, content of biologically active substances in fruit and utilization of black currant fruit in food industry. In the second chapter there are characteristics, importance and methods of determination of phenolic compounds. Vitamin C is describe in the last chapter, its characteristics, importance and methods of determination.

Experimental part describes determination of three chemical characteristic of black currant fruits: content of total phenolic compounds, content of total anthocyanins and content of vitamin C. Twelve modern varieties of black currant were selected for determination. Based on these results, it is possible to deduce the more important varieties. The content of total phenolic compounds was in the range of 326,7–641,4 mg·100 g⁻¹ in all samples. The content of total anthocyanins was analysed in the range from 102,5 to 284,5 mg·100 g⁻¹ in all samples. And content of vitamin C was in the range from 82,0 to 379,1 mg·100 g⁻¹ in all samples. The overall comparison of the varieties of black currant was found, the varieties Ceres, Ben Hope, Ben Lomond, Démon and Ometa are the most promising varieties in terms of the content of the above mentioned compounds.

KLÍČOVÁ SLOVA

Černý rybíz, fenolické látky, vitamin C, metody stanovení.

KEYWORDS

Black currant, phenolic compounds, vitamin C, methods of determination.

KANIOVÁ, L. *Analýza šťáv vybraných odrůd černého rybízu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 75 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje byly správně a úplně citovány. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí RNDr. Mileně Vespalcové, Ph.D. za vstřícnost a odborné vedení v průběhu zpracování diplomové práce.

Mé díky patří také Ing. Zuzaně Olšovcové za poskytnuté rady při práci v laboratoři.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Černý rybíz	8
2.1.1	Botanický popis	8
2.1.2	Výskyt a optimální podmínky	8
2.1.3	Zástupci	9
2.1.4	Choroby a škůdci	10
2.1.5	Obsah biologicky účinných látek v plodech černého rybízu.....	11
2.1.6	Využití černého rybízu v potravinářství	16
2.2	Fenolické látky	18
2.2.1	Fenolické kyseliny	18
2.2.2	Flavonoidy	19
2.2.3	Lignany.....	23
2.2.4	Tanniny.....	23
2.2.5	Stilbeny.....	23
2.2.6	Faktory ovlivňující obsah fenolických látek	24
2.2.7	Metody stanovení fenolických látek.....	24
2.3	Vitamin C	28
2.3.1	Struktura	28
2.3.2	Biologická aktivita.....	28
2.3.3	Fyziologie a výživa.....	29
2.3.4	Použití.....	31
2.3.5	Stanovení vitaminu C	32
3	Experimentální část.....	38
3.1	Použité vzorky	38
3.2	Stanovení celkových fenolických látek pomocí Folin–Ciocalteuova činidla.....	38
3.2.1	Použité pomůcky, přístroje a chemikálie.....	38
3.2.2	Příprava roztoků a kalibrační řady.....	39
3.2.3	Příprava vzorků a vlastní analýza	39
3.2.4	Výpočet.....	40
3.3	Stanovení celkových anthokyanů pomocí pH diferenciální metody	40
3.3.1	Použité pomůcky, přístroje a chemikálie.....	40
3.3.2	Příprava roztoků	41
3.3.3	Příprava vzorků a vlastní analýza	41

3.3.4	Výpočet.....	41
3.4	Stanovení vitamínu C metodou HPLC	42
3.4.1	Použité pomůcky, přístroje a chemikálie.....	42
3.4.2	Příprava roztoků a kalibrační řady.....	43
3.4.3	Příprava vzorků a vlastní analýza	43
3.4.4	Výpočet.....	44
3.5	Statistické zpracování výsledků.....	44
4	Výsledky a diskuze.....	46
4.1	Stanovení celkového obsahu fenolických látek.....	46
4.1.1	Stanovení fenolických látek ve vzorcích z VSUO	46
4.1.2	Stanovení fenolických látek ve vzorcích od pěstitele SP	48
4.1.3	Celkové porovnání odrůd na základě obsahu fenolických látek	50
4.2	Stanovení celkového obsahu anthokyanů.....	51
4.2.1	Stanovení anthokyanů ve vzorcích z VSUO	51
4.2.2	Stanovení anthokyanů ve vzorcích od SP.....	54
4.2.3	Celkové porovnání odrůd na základě obsahu anthokyanů	55
4.3	Stanovení obsahu vitamínu C	56
4.3.1	Stanovení obsahu askorbové kyseliny ve vzorcích z VSUO.....	57
4.3.2	Stanovení kyseliny askorbové ve vzorcích od SP	59
4.3.3	Celkové porovnání odrůd na základě obsahu kyseliny askorbové.....	61
5	Závěr.....	62
6	Seznam použitých zdrojů	64
7	Seznam zkratk	72
8	Seznam příloh.....	73
9	Přílohy	74
9.1	Příloha 1: Kalibrační křivka kyseliny kalové	74
9.2	Příloha 2: Kalibrační křivky kyseliny askorbové	74
9.3	Příloha 3: Ukázka chromatogramu	75

1 ÚVOD

Černý rybíz (*Ribes nigrum L.*) patří mezi drobné bobulovité ovoce. Černý rybíz je jedním ze zástupců rodu *Ribes* a pěstuje se zejména v oblastech mírného a subtropického pásma v Evropě a Asii. Plodem je šťavnatá, lysá, černá bobule, která dozrává od konce června do půlky srpna. Z plodů černého rybízu je vyráběno široké spektrum potravinářských výrobků, jako např. alkoholické a nealkoholické nápoje, džemy, rosoly, cukrovinky a mrazírenské výrobky s obsahem černého rybízu nebo s jeho příchutí.

Černý rybíz je ve výživě vyzdvihován zejména kvůli významnému obsahu vitamínu C a obsahu fenolických látek. Tyto bioaktivní látky působí jako antioxidanty a chrání tak naše tělo před volnými radikály. Volné radikály jsou v těle příčinou různých onemocnění, např. kardiovaskulárního systému, očních chorob, diabetu nebo zhoubného bujení. Vitamin C je důležitý pro normální fyziologické funkce. Pomáhá v metabolismu tyrosinu, kyseliny listové a tryptofanu. Přispívá k syntéze karnitinu a katecholaminů, které regulují nervový systém. Avitaminosa vitamínu C způsobuje kurděje, ale tato nemoc se dnes vyskytuje velice vzácně. Hypovitaminosa se projevuje oslabeností organismu. Dospělý člověk by měl přijmout 80 mg vitamínu C denně.

Diplomová práce je součástí projektu s názvem Výzkum nových technologií v pěstování angreštu a rybízu se zaměřením na kvalitu a využití plodů – QI111A141. Projekt je realizován v rámci dlouhodobé spolupráce FCH VUT a Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského v Holovousích. Cílem projektu je podpora pěstování nově vyšlechtěných odrůd uvedeného drobného ovoce.

Náplní této diplomové práce bylo stanovit obsah důležitých biologicky aktivních látek plodů vybraných moderních odrůd černého rybízu pěstovaných v klimatických podmínkách ČR. Ke vzájemnému porovnávání plodů 12 odrůd černého rybízu, pěstovaných na 2 stanovištích a ve 2 tvarových formách, bylo vybráno stanovení obsahu celkových fenolických látek celkových anthokyanů a vitamínu C.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Černý rybíz

Plody černého rybízu patří mezi drobné ovoce. Taxonomicky je rostlina zařazena do rodu *Ribes* čeledi meruzalkovitých (*Grossulariaceae*), kam také kromě rybízu patří angrešt a kříženci rybízu a angreštu. Latinsky se rostlina nazývá *Ribes nigrum* L. [1]

První záznam o rybízu pochází z roku 1184 z Mohučského herbáře. První popis pěstování rybízu se uvádí v knize Gaerde der Sundheit z konce 15. století. Avšak první botanický popis rybízu přísluší Jeanu Ruellovi, který v roce 1536 publikoval jeho dnes nejznámější dílo *De natura stirpium libri tres*. Počátek šlechtění rybízu je datován do 16. století. Jednotlivých odrůd rybízů postupně s roky přibývalo. V 18. století uvedl *Dictionary of Gardening and Botany* 10 odrůd rybízu, ale v anglickém zahradním katalogu z 19. století je už uvedeno 35 odrůd rybízu. [2, 3]

Počátek pěstování rybízu u nás není přesně datován, ale předpokládá se, že na našem území byl rybíz znám již v 16. století. Pravděpodobně byl na naše území dovezen z Německa. Bývalé Československo bylo v roce 1933 považováno za velké pěstitelské středisko rybízů – 9 933 tun. Počátky šlechtění a výzkumu rybízů se u nás datují od 50. let minulého století. V této době začalo i významnější pěstování rybízů u nás, a to především z iniciativy zpracovatelského průmyslu. [4, 5]

2.1.1 Botanický popis

Rybíz tvoří víceleté keře s rozložitým až vzpřímeným vzrůstem. Jsou to především opadavé, zřídka kdy vždy zelené keře. Leterosty jsou holé a beztrnné. Koncem května až začátkem června letorosty narůstají nejintenzivněji. Květy kvetou přímo na jednotlivých výhonech nebo na plodonosném obrostu dvouletých větví, méně na starších větvích. Pro úspěšnou sklizeň je zapotřebí odstraňovat přestárlé dřevo, protože na starších výhonech jsou bobule drobné a kyselé. [2, 6, 7]

Květy jsou drobné, zelenkavé až špinavě červené, žluté, zřídka bílé. Soukvětí je střapcovité nebo jsou květy ve svazečkách, případně jednotlivě. Jednotlivé květy jsou talířovitého nebo miskovitého až zvonkovitého tvaru. Kvetou časně, asi od druhé poloviny dubna. Délka kvetení je 8–20 dní podle teplotních podmínek. Opylování probíhá entomofilně (hmyzem). [2, 6]

Plody dozrávají podle odrůdy od 20. června do půlky srpna. Plod je šťavnatá, lysá bobule se zbytkem neopadavého kalicha. Jednotlivé bobule obsahují různý počet semen, která mají zřetelný endosperm a dvojvrstvé osemení. Bobule černého rybízu jsou černé. Plodnost negativně ovlivňuje špatné opylování, mrazové poškození, vlhké a chladné počasí v době sklizně. Černý rybíz se musí sklízet včas, jelikož jeho plody lehce opadávají. [2, 6, 7]

Kořenová soustava je středně silná, roste nejčastěji mělce a do šířky. Většina částí kořenu se rozkládá v hloubce kolem 20 cm. Nadzemní části rybízu velmi snadno zakořeňují. [6]

2.1.2 Výskyt a optimální podmínky

V čeledi meruzalkovitých se nachází asi 120 druhů, z toho je kolem 110 druhů rozšířeno především v mírném a subtropickém pásu Evropy a Asie. V menší míře se vyskytují v Severní a Jižní Americe a severní Africe. V Austrálii se nenachází žádný druh. [4]

Černý rybíz je středně náročná plodina, která má raději teplejší polohy a slunná stanoviště. Nejvhodnější místa jsou s nadmořskou výškou do 500 m, s průměrnou roční teplotou 7–9 °C.

Plodina může být i v polostínu, pokud letní teploty často přesahují 32 °C. Vhodná je půda humózní, písčitohlinitá s minimální potřebou vláhy a ročním srážkovým úhrnem 350–400 mm. [7] pH půdy není rozhodující, optimum se pohybuje v rozmezí 5,5–7. [8]

Kvalita slunečního záření má vliv i na některé obsahové látky, např. kyselinu askorbovou. Bylo zjištěno, že ovoce pěstované na jižních svazích obsahuje až o 20 % více kyseliny askorbové než ovoce pěstované na severních svazích na stejném místě. [9]

2.1.3 Zástupci

Dle barvy rozdělujeme rybíz na bílé, červené a černé. Ve státní odrůdové knize České republiky je k 15. červnu 2014 zapsáno celkem 23 odrůd rybízu, z toho jsou 2 odrůdy bílé (Jantar, Orion), 10 odrůd je červených (Heinemannův pozdní, Holandský červený, Korál, Kozolupský raný, Losan, Rondon, Rovada, Rubigo, Trent, Vitan) a 11 odrůd je černých (Ben Gairn, Ben Hope, Ceres, Démon, Focus, Moravia, Tiben, Tisel, Titania, Triton, Vebus). [10]

Existuje ještě mnoho dalších odrůd, které se pěstují. Z bílých odrůd jsou to například odrůdy Blanka, Primus a Viktoria, z červených Detvan, Jonkheer van Tets, Maraton, Red Lake a Tatran, z černých Eva, Favorit, Otelo, Öjebyn a Roodknop. [7]

Bližší popis některých výše zmíněných odrůd černého rybízu:

- **Ben Gairn** je odrůda pocházející z Velké Británie, která vznikla křížením odrůd Ben Alder a Golubka. Je to úrodná odrůda se sladkými plody s vysokou odolností vůči angreštovému padlí.
- **Ben Hope** je odrůda původem z Velké Británie, která vznikla křížením odrůd Westa a dvou genotypů. Patří mezi úrodné odrůdy s chutnými sladkokyselými a aromatickými plody. Je nenáročná před výsadbou a během pěstování. Má velmi vysokou odolnost vůči angreštovému padlí a vlnovníku rybízovému.
- **Démon** je původem česká odrůda vzniklá křížením odrůd Fertodi I. a Roodknop. Tato odrůda má sladké plody, je středně odolná proti angreštovému padlí a vysoce odolná vůči nízkým teplotám během kvetení.
- **Favorit** je odrůda původem ze Slovenska, která vznikla křížením druhu *Ribes dikuscha* a odrůdy Topsy. Patří mezi úrodné odrůdy s lahodnými a sladkými plody. Je náročná před výsadbou a během pěstování, ale vyžaduje ruční sklizeň. Odolnost vůči angreštovému padlí je nízká a také je málo odolná vůči nízkým teplotám v době kvetení.
- **Tiben** je původem polská odrůda, která vznikla křížením odrůd Titania a Ben Nevis. Patří mezi úrodné odrůdy s lahodnými a aromatickými plody. Je nenáročná před výsadbou a během pěstování. Má velmi vysokou odolnost vůči angreštovému padlí a rzi vejmutovce. [7]

Šlechtitelské stanice se snaží vypěstovat odrůdy rybízů, které jsou výkonnější, vzrostlejší, vzpřímeně rostoucí, snadno rozmnožitelné, vhodné pro intenzivní výsadby, odolné proti chorobám listů (hlavně proti antraknóze a virózám) a proti sprchávání plodů zejména u černých rybízů. Dále se požadují vyrovnané a velké bobule, které současně dozrávají a mají barevnou šťávu. U černých rybízů se navíc požaduje vysoký obsah vitamínu C a dobré konzervárenské vlastnosti. Vlivem mechanizace sklizně se dnes požadují odrůdy s kratšími a těsně přiléhavými hroznými. [6]

2.1.4 Choroby a škůdci

Mezi nejčastější choroby rybízu patří:

- **okrajová spála listů** se vyskytuje nejčastěji na odrůdách rybízu. Je způsobena nedostatkem draslíku a některých mikro prvků nebo nadbytkem chloru. Okraje listů se u této choroby nejprve barví do světle zelena až žluta, poté hnědnou, až černají a svinují se na rubovou stranu. Následně dojde k uschnutí a opadání listů. Postižené keře pak méně kvetou, plody mají horší jakost a zdobňují se. Keře se chrání aplikací kombinovaných hnojiv (např. NPK).
- **hnědé padlí angreštové** je choroba nejen angreštů, ale i rybízů. Projevuje se nejprve bílým povlakem na listech, letorostech a plodech, který později hnědne. Letorosty poté přestávají růst, listy se deformují a zasychají, plody jsou nevzhledné a mají nepříjemnou chuť. Choroba je schopna přezimovat a následující rok mladé větvičky zasychají. Ochranou proti této chorobě je každoroční zkracování konců a postřik v době kvetení.
- **rez vejmutovka** se vyskytuje tam, kde jsou kromě rybízů také borovice, jelikož tato choroba je dvouhostitelská. Na začátku léta se na čepelích objevují světle žluté skvrny, na rubu listů se objevují žluté kupky letních výtrusů. V půlce léta se pak tvoří hnědé zimní výtrusy a listy postupně žloutnou, deformují se a odumírají. V důsledku opadání listů dochází ke snížení množství a jakosti sklizně. Nepřímou ochranou je dostatečná vzdálenost mezihostitelů. Přímou ochranou je hnojení a odstraňování napadených listů.
- **antraknóza rybízu** je houbové onemocnění, které se šíří za vlhka a tepla. Objevuje se na konci jara zejména na spodních listech keřů v podobě žlutých až černých skvrn. Při větším napadení listy předčasně opadají a způsobují oslabení rostliny, která může být poškozena při přezimování. Účinnou ochranou je postřik. [4, 7]

Nejčastějšími škůdci, kteří napadají rybízy, jsou:

- **vlnovník rybízový** je drobný roztoč, který se živí šťávou z rostlinných pletiv pupenů v době rašení. Způsobuje zduření pupenů, které neraší, hnědnou a zasychají. Vlnovník přezimuje jako dospělý jedinec v pupenech. Ochrany jsou dvojího typu, a to mechanická (sběr zduřených pupenů) a chemická (postřik).
- **mšice rybízová** se vyskytuje nejčastěji u červeného a bílého rybízu, ale najdeme ji i na černých odrůdách. Je to malá (1,2–1,8 mm), bezkřídlá nebo okřídlená živorodá samička, která klade po jednom vajíčku k pupenu rybízu na podzim. Larvy se líhnou na jaře a usadí se na rubu listů, kde sají a způsobují zelené, žluté i červené puchýře. Ochranou je postřik.
- **pílatka rybízová** patří mezi listožravé škůdce. Je to červenožlutá muška s černou hlavou, která je škodlivá ve stavu zelené housenky. Nejdříve vyžírá dírký do listů, později ožírá celé listy a ponechává pouze hlavní žebra čepele. Poškozené keře slábnou, plody se nevyvíjejí a je narušena diferenciací květních pupenů. Ochranou je postřik. [4, 7]

2.1.5 Obsah biologicky účinných látek v plodech černého rybízu

Nejen rybíz, ale i ostatní druhy ovoce mají vysoký obsah vody – většinou přes 80 %. Kalorická hodnota černého rybízu není vysoká, protože obsahují málo sacharidů, tuků a dusíkatých látek. [4, 11] Porovnání energetických hodnot vybraného ovoce je uvedeno v Tab. 1.

Tabulka 1: Energetické hodnoty vybraného ovoce [11]

Druh ovoce	Energetická hodnota (kJ/100 g jedlého podílu)	Energetická hodnota (kcal/100 g jedlého podílu)
banány	415	98
jablka	219	52
jahody	158	37
ostružiny	225	54
rybíz černý	205	49
rybíz červený	258	62

Celkový obsah cukrů se u rybízu pohybuje v rozmezí 2,5–10 %. Nejvyšší podíl mají monosacharidy, a to fruktosa a glukosa, které jsou snadno stravitelné pro organismus. Jejich množství závisí od druhu, odrůdy i teplotního charakteru roku. [4, 6] Průměrný obsah fruktosy se pohybuje kolem 4 g na 100 g jedlého podílu a průměrný obsah glukosy se pohybuje kolem 3 g na 100 g jedlého podílu. [11] Rybíz se od většiny druhů ovoce odlišuje nízkým obsahem sacharosy (Tab. 2).

Tabulka 2: Obsah sacharosy ve vybraných druzích ovoce [11]

Druh ovoce	Obsah sacharosy (g/100 g jedlého podílu)
jablka	2,5
mandarinky	4,0
pomeranče	2,7
rybíz černý	0,3
rybíz červený	0,4

Obsah vlákniny je rozdílný podle druhu a stáří plodů, množství a velikosti semen, vegetačních podmínek apod. Srovnáním obsahu vlákniny v černém rybízu s jinými druhy ovoce zjistíme, že rybíz patří mezi ovoce s bohatším obsahem vlákniny (Tab. 3). [6]

Tabulka 3: Obsah vlákniny u vybraných druhů ovoce [11]

Druh ovoce	Obsah vlákniny (g/100 g jedlého podílu)
banán	2,3
jablko	2,3
maliny	6,4
rybíz černý	5,8
rybíz červený	5,4

Dostatečné množství pektinových látek zabezpečuje tvorbu rosolů, které jsou důležité pro konzervářenské výrobky. U zralých plodů se protopektin štěpí na pektin, a tím se schopnost tvořit rosoly snižuje. Obsah pektinových látek bývá u černého rybízu v rozmezí 0,1–1,6 %. [4, 6]

Obsah tuků a bílkovin z hlediska složení a množství nemá pro výživu praktický význam. Průměrný obsah tuků se pohybuje od 0,5 do 1,7 %, bílkovin od 0,9 do 1,9 %. [4, 6]

Z hlediska výživy člověka je v rybízu důležitý obsah vitaminů, zejména vitaminu C. Méně zastoupeny jsou ostatní vitaminy (Tab. 4).

Tabulka 4: Obsah vitaminů v plodech černého rybízu [11]

Vitaminy	Obsah	Jednotka
vitamin A	7	RE*
beta-karoten	81	μg
vitamin B ₁	0,05	mg
vitamin B ₂	0,05	mg
vitamin E	2,1	ATE**
alfa-tokoferol	2,1	mg

*1 RE (ekvivalent retinolu) udává aktivitu odpovídající 1 μg retinolu, ** 1 ATE (ekvivalent alfa-tokoferolu) udává aktivitu odpovídající 1 mg alfa-tokoferolu [12]

Vitamin C se v plodech z 95 % vyskytuje v redukované formě kyseliny L-askorbové. Obsah vitaminu C stoupá až do doby ukončení růstu plodu. Pak začne klesat, a to až o 1 % denně. Obsah vitaminu C závisí od charakteru klimatických podmínek v průběhu roku a od samotné odrůdy. [4, 6]

Pokud srovnáme obsah vitaminu C (Tab. 5) v černém rybízu s citróny, tak 5 kg černého rybízu z jednoho keře obsahuje přibližně stejné množství vitaminu C jako 17 kg citrónů. Pokud by 100 g černého rybízu obsahovalo 166 mg vitaminu C, tak k pokrytí doporučené denní dávky vitaminu C (= 80 mg dle Směrnice č. 2008/100/ES) by stačilo sníst pouze 48 g plodů. [13]

Tabulka 5: Obsah kyseliny askorbové u vybraných druhů ovoce [11]

Druh ovoce	Obsah kyseliny askorbové (mg/100 g jedlého podílu)
citróny	49,0
jablka	9,3
maliny	24,3
rybíz černý	166,0
rybíz červený	34,5

Z organických kyselin obsahuje rybíz především tzv. ovocné kyseliny – citronová, jablečná a vinná. Další kyseliny, jako jantarová, mravenčí a šťavelová, jsou zastoupeny v zanedbatelných množstvích. Tyto kyseliny se při látkových přeměnách transformují na kyselé uhličitany a organismus tak získává určitou energii. Obsah organických kyselin se pohybuje v rozmezí 1–4 %. Příznivý obsah kyselin usnadňuje zpracování a úchovu výrobků, díky tomu, že nízké pH brzdí rozvoj bakterií nebo některé bakterie zcela ničí. [4, 6]

Minerální látky jsou v rybízech zastoupeny také, nejvíce je jich v černých rybízech (srovnání obsahu černého a červeného rybízu je uvedeno v Tab. 6).

Tabulka 6: Obsah minerálních látek v černém a červeném rybízu [11]

Minerální látky	Obsah (mg/100 g jedlého podílu)	
	černý rybíz	červený rybíz
sodík	5	4
hořčík	9	12
fosfor	50	30
draslík	306	225
vápník	45	28
železo	1,4	1,1

Obsah tříslovin se u rybízu pohybuje v rozmezí 0,4–0,8 %. Přítomnost tříslovin se projeví ztmavnutím vylisovaných šťáv. Třísloviny u ovocných vín usnadňují proces číření a zvyšují jejich trvanlivost. [4, 6]

Černý rybíz je také zajímavý po obsahové stránce fenolických látek, včetně flavonoidů jako jsou anthokyany, prokyanidiny, flavonoly a fenolické kyseliny. Obsah fenolických látek v černém rybízu je velmi variabilní, rozmezí se pohybuje mezi 227–789 mg na 100 g čerstvých plodů. [14]

Aroma černého rybízu se skládá z více než 150 aromatických sloučenin, které mu udělují charakteristický flavour. Z chemického hlediska se jedná o komplexní směs nasycených a nenasycených aldehydů a ketonů, esterů, alkoholů a thiolů. [15] Černý rybíz má kočičí příchut, který je způsoben tzv. merkaptanem černého rybízu (4-methoxy-2-methylbutan-2-thiol). Ve šťávě černého rybízu se ho nachází kolem $0,2 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. Dalšími složkami příchutě jsou tzv. kočičí keton (4-merkapt-4-methylpentan-2-on) a 8-merkaptomethonu. [16]

Sacharidy

Sacharidy jsou jedny z nejrozšířenějších přírodních látek obsažené v rostlinných a živočišných buňkách. Chemicky jsou sacharidy polyhydroxyaldehydy neboli aldosa nebo polyhydroxyketony neboli ketosa. Každá aldosa nebo ketosa musí obsahovat alespoň tři alifaticky vázané atomy uhlíku. Podle počtu alifaticky vázaných atomů uhlíků se sacharidy dělí na triosy, tetrosy, pentosy, hexosy, heptosy, ... Některé sacharidy mohou tvořit pětičlenné (furanosy) nebo šestičlenné (pyranosy) kruhy. Dle počtu cukerných jednotek v molekule sacharidu se mohou dělit na monosacharidy (jedna jednotka), disacharidy (dvě jednotky), oligosacharidy (do deseti jednotek) a polysacharidy (více než 10 jednotek).

Metabolismus sacharidů (biosyntéza a degradace) je důležitý pro všechny živé organismy. Rostliny (fotoautotrofní organismy) využívají sacharidy jako vlastní zdroj energie a syntetizují z nich součásti buněčné stěny a další biologicky aktivní látky (glykoproteiny, proteoglykany, glykolipidy, některé hormony, koenzymy, vitaminy, ...). Heterotrofní organismy musí sacharidy získávat z autotrofních organismů nebo z nesacharidových látek (některé aminokyseliny, hydroxykyseliny, glycerol, ...). Tento proces se nazývá glukoneogeneze.

Vláknina

Vláknina (polysacharid) je důležitou složkou potravy, která se nachází ve všech druzích ovoce a zeleniny. Jejím hlavním benefitem je pozitivní účinek na gastrointestinální trakt. Existují dva druhy, a to rozpustná a nerozpustná vláknina. Mezi vlákninu rozpustnou ve vodě se řadí část hemicelulóz, pektiny, rostlinné slizy, agar a inulin. Rozpustná vláknina bobtná v žaludku, a tak prodlužuje pocit sytosti. Ve střevě působí jako prebiotikum a omezuje vstřebávání tuků a sacharidů přes střevní stěnu. Mezi nerozpustnou vlákninu patří část hemicelulóz, celulósa, lignin, rezistentní škroby a chitin. Nerozpustná vláknina zvětšuje objem střevní pasáže, a tím urychluje peristaltiku střev. Doporučená denní dávka vlákniny je 30 g pro dospělého člověka dle Společnosti pro výživu, která zpracovává stravovací doporučení pro ČR. [17]

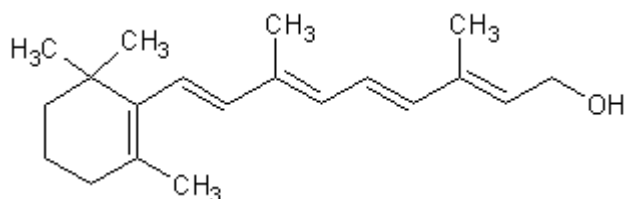
Pektin

Pektin je polysacharid chemicky známý jako methylester kyseliny polygalakturonové. Je tvořen jednotkami D-galakturonové kyseliny s vazbami α -(1 \rightarrow 4). Pektinová matrice je důležitá pro udržení integrity buněčné stěny, protože tvoří příčnou vložku mezi xyloglukan-celulosovými mikrovláknny. V průběhu zrání vznikají enzymy (např. polygalakturonasa, pektin methyesterasa, β -galaktosidasa,...), které jsou schopné rozvolnit tyto polymerní vlákna. Ztráta soudržnosti pektinové sítě je zodpovědná za měknutí ovoce v průběhu zrání. [18]

Vitaminy

Vitaminy jsou skupina esenciálních nutrientů, které lidské tělo vyžaduje pro různé biochemické a fyziologické procesy. Většinou si je lidské tělo neumí tvořit, proto musí být přijímány z denní stravy. Vitaminy můžeme rozdělit do dvou skupin, na ve vodě rozpustné (C a B komplex) a v tuku rozpustné vitaminy (A, D, E a K).

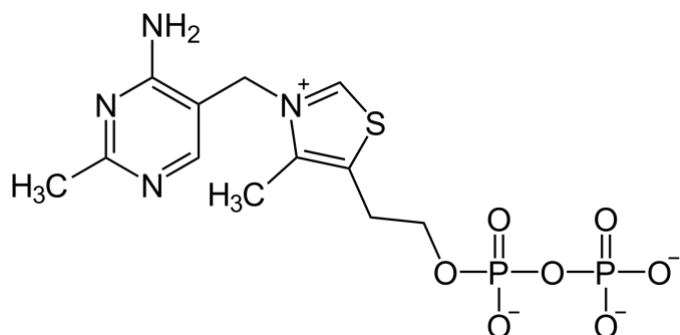
Vitamin A je v tucích rozpustný vitamin zahrnující skupinu izoprenoidních látek. Základní biologicky aktivní formou je all-trans-retinol (Obr. 1), ale aktivitu vitaminu A vykazuje více než 50 přírodních látek, tzv. provitaminy A. Provitaminy A zahrnují katotenoidy, což je skupina uhlovodíků (karoteny) a jejich oxidovaných derivátů (xantofilní látky) obsahujících osm spojených izoprenoidních jednotek. Nejvýznamnějším provitaminem A je β -karoten. Vitamin A je důležitý pro růst, rozvoj, udržení imunitního systému a dobré vidění. [12] Jeho doporučená denní dávka je 800 μ g na den pro dospělého člověka. [13] Vitamin A se nachází v živočišných produktech, jako jsou mléčné produkty a vejce, dále také v hovězích a vepřových játrech. Provitaminy A se nacházejí v zelenině a ovoci, jako např. v mrkvi, sladkých bramborách, špenátu a meruňkách. [12]



Obrázek 1: all-trans-retinol

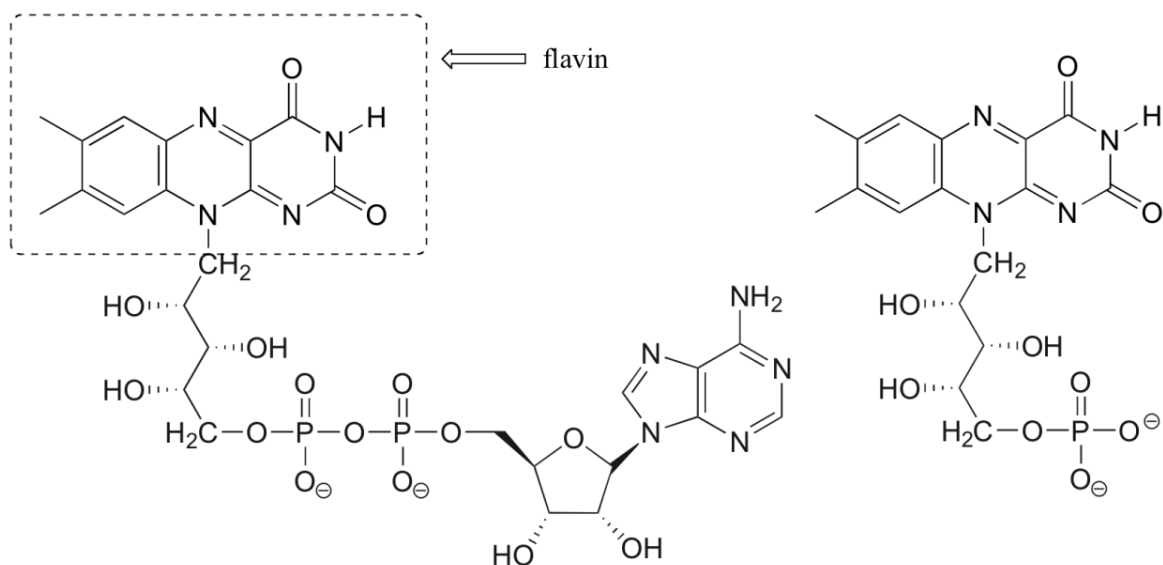
Vitamin B₁ neboli thiamin je ve vodě rozpustný vitamin. Biologicky aktivní forma – thiamindifosfát (Obr. 2) je důležitý pro energetický metabolismus a přenos nervových vzruchů. [12] Jeho doporučená denní dávka je 1,1 mg na den pro dospělého člověka. [13] Nejvíce

vitaminu B₁ je obsaženo ve vepřovém mase, ovesných vločkách, vlašských a lískových ořechách a čočce. [12]



Obrázek 2: thiamindifosfát

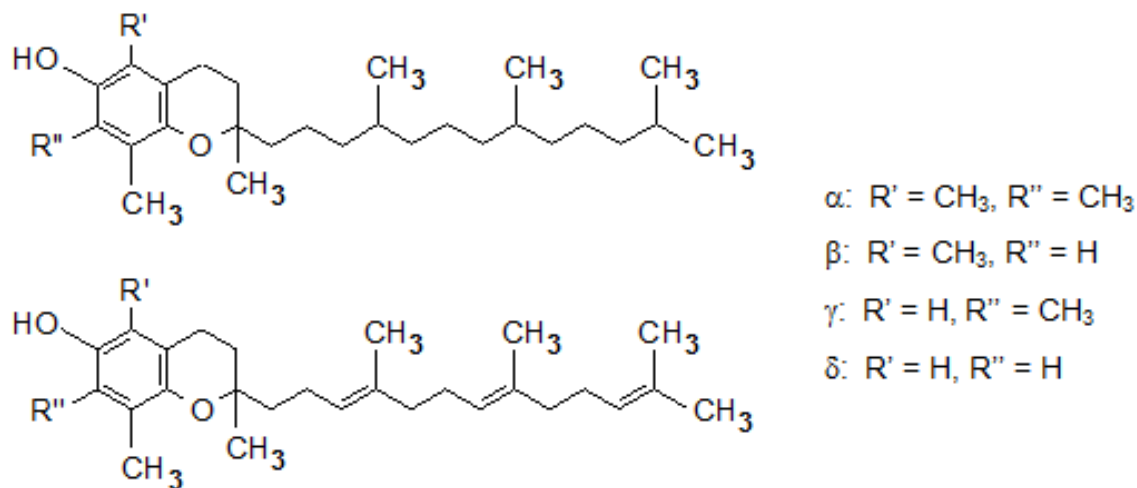
Vitamin B₂ neboli riboflavin je taktéž ve vodě rozpustný vitamin. Jeho aktivními formami jsou koenzymy FAD (flavinadeninukleotid) a FMN (flavinmononukleotid) – Obr. 3, které jsou součástí flavoproteinových dehydrogenáz a oxidáz. Riboflavin má několik funkcí, a to transport elektronů v citrátovém cyklu, působení FMN a FAD v oxido-redukčních reakcích aminokyselin, sacharidů, purinů a pyrimidinů a antioxidační ochranu organismu. [12] Doporučená denní dávka činí 1,4 mg na den pro dospělého člověka. [13] Zdrojem vitaminu B₂ jsou hlavně hovězí a vepřová játra, mléko a mléčné produkty, ovesné vločky a vejce. [12]



Obrázek 3: vlevo FAD a vpravo FMN

Vitamin C – viz kapitola 2.5

Vitamin E je v tucích rozpustný vitamin zahrnující molekuly s α -tokoferolovou antioxidační aktivitou. Tuto aktivitu vykazuje osm strukturně příbuzných látek se společným základem – tokoferol a tokotrienol (Obr. 4). Vitamin E je nejvýznamnější lipofilní antioxidant, který chrání nenasycené mastné kyseliny před volnými radikály. Dále chrání spolu s β -karotenem strukturu membrán a působí preventivně proti kardiovaskulárním chorobám a rakovině. [12] Doporučená denní dávka je 12 mg na den pro dospělého člověka. [13] Dobrymi zdroji vitaminu E jsou vlašské a burské ořechy, hrášek, mrkev, špenát a ovesné vločky. [12]



Obrázek 4: tokoferol (nahore) a tokotrienol (dole)

2.1.6 Využití černého rybízu v potravinářství

Většina druhů drobného ovoce byla pěstována pro obsah chuťových a aromatických látek a pro rozvoj lékařské vědy, která objasnila význam pro lidský organismus. Vitamin C má nejdůležitější úlohu při konzumaci čerstvého i v dalších formách uchovávaného ovoce. Požívání drobného ovoce má příznivý vliv při dietách, protože drobné ovoce není příliš kalorické. [6]

Kromě požadavků zdravé výživy má na rozšiřování pěstování také vliv konzervářská a mrazírenská technologie. Protože konzervované a mražené ovocné výrobky mohou být k dispozici celý rok, uchovávání má mimořádný význam. [6]

Rybízy jsou pro Evropu ekonomicky důležité ovoce. V letech 2000 až 2013 vyprodukovala Evropa průměrně 704 000 tun rybízů, což je 98,5 % celosvětové produkce. Česká republika vyprodukovala za stejné období v průměru 5 000 tun, což odpovídá 0,7 % celosvětové produkce. [19]

Nejzdravější je konzumace čerstvého černého rybízu, ale vzhledem k jeho nedostupnosti na českém trhu je tato konzumace značně omezena jen pro pěstitele. Na našem trhu se nedá černý rybíz zakoupit ani jako mražený či konzervovaný produkt. Z toho vyplývá, že o samotný čerstvý černý rybíz u nás není zájem. V jiných zemích např. Velké Británii se černý rybíz dá zakoupit čerstvý i mražený. Dnes se černý rybíz pěstuje zejména kvůli produktům z něj vyrobených. Na našem trhu je obrovská škála produktů s černým rybízem nebo s jeho příchutí – sirupy, džemy, rosoly, cukrovinky, mrazírenské výrobky, nealkoholické a alkoholické nápoje. Příklady výrobků s obsahem černého rybízu nebo jeho příchutí jsou uvedeny na Obr. 5.

Anthokyany v plodech černého rybízu lze využít jako aditivní látku – E 163. Jejich obrovskou nevýhodou je nestabilita, která ovlivňuje barvu. Mohou se použít jen u kyselých potravin do pH 3,5. Anthokyany jako přírodní barviva jsou významné pro potravinářský průmysl, protože zájem populace o přírodní látky roste. EFSA (European Food Safety Authority) v roce 2013 potvrdila bezpečnost této aditivní látky získané z černého rybízu. [20]

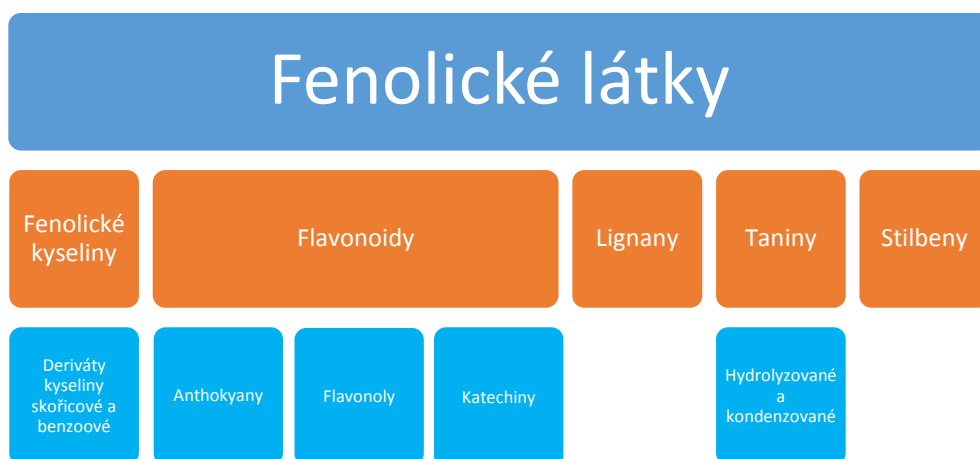


Obrázek 5: První řádek zleva – Džem ASO, rosol Labora, pečený čaj NoTea, tyčinka Mixit a sorbet Carte d'or. Druhý řádek zleva – likér Gölles, sladový alkoholický nápoj Frisco, vodka Finlandia, sirup Yo, balená voda Mattoni a džus Cappy.

2.2 Fenolické látky

Fenolické látky jsou sekundárními metabolity rostlin, které chrání rostlinu před UV zářením, hmyzem, viry a bakteriemi. [21] Tyto látky jsou zdraví prospěšné, protože mají antioxidační a protizánětlivé účinky a pomáhají v prevenci proti kardiovaskulárním a nádorovým nemocem. [22–25]

Fenolické látky obsahují jeden nebo více aromatických kruhů s různým stupněm hydroxylace, methylace a glykosylace. Tyto látky přispívají k barvě ovoce, jejich hořkosti a svíravosti. Fenolické látky se dělí do několika kategorií – fenolické kyseliny, flavonoidy, lignany, taniny a stilbeny (Obr. 6). [26, 27]



Obrázek 6: Grafické znázornění dělení fenolických látek

2.2.1 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny lze rozdělit na deriváty kyseliny skořicové a benzoové, které obsahují jeden aromatický kruh. Na aromatickém kruhu musí být alespoň jeden vodík substituovaný hydroxylovou skupinou.

Nejběžnějšími deriváty kyseliny skořicové identifikované v bobulích černého rybízu jsou kyselina ferulová, hydroxykávová, kávová, m-kumarová, p-kumarová a sinapová (Tab. 7). Kyselina gentisová, gallová, p-hydroxybenzoová, protokatechinová, salicylová a vanilová patří mezi nejběžnější deriváty kyseliny benzoové v plodech černého rybízu (Tab. 7). [28]

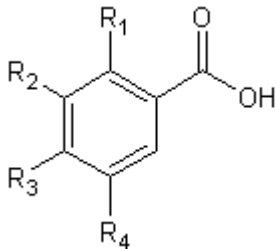
Tabulka 7: Deriváty kyseliny skořicové

Struktura kyseliny skořicové ($R_{1-4} = H$)

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Název
	H	OCH ₃	OH	H	ferulová kyselina
	H	OH	OH	H	kávová kyselina
	H	OH	OH	OH	hydroxykávová kyselina
	H	OH	H	H	m-kumarová kyselina
	H	H	OH	H	p-kumarová kyselina
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	sinapová kyselina

Tabulka 8: Deriváty kyseliny benzoové

Struktura benzoové kyseliny ($R_{1-4} = H$)

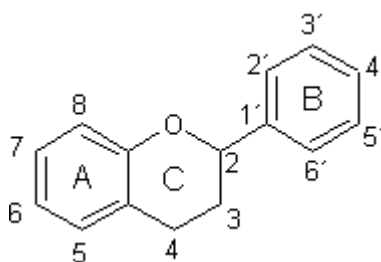
	R_1	R_2	R_3	R_4	Název
	OH	H	H	OH	gentisová kyselina
	OH	OH	OH	H	gallová kyselina
	H	OH	H	H	p-hydroxybenzoová kyselina
	OH	OH	H	H	protokatechinová kyselina
	OH	H	H	H	salicylová kyselina
	OCH ₃	OH	H	H	vanilová kyselina

Všechny fenolické kyseliny jsou syntetizovány v šikimátové dráze z L-fenylalaninu nebo L-tyrosinu. Nejdříve dochází k deaminaci fenylalaninu, resp. tyrosinu, a vzniká kyselina skořicová, resp. p-kumarová. Aromatický kruh těchto kyselin je následně hydroxylován a methylován, a tak vznikají jejich deriváty (ferulová a kávová kyselina). Benzoová kyselina vzniká degradací postranního řetězce skořicové kyseliny. Deaminace, hydroxylace a methylace jsou základními reakcemi ke vzniku fenolických kyselin. [21]

Ferulová a kávová kyselina jsou fenolické látky s alelopatickou aktivitou, což znamená, že je rostlina vyvíjí za účelem inhibice jiných rostlinných konkurentů. Fenolické kyseliny jsou přítomné téměř ve všech potravinách rostlinného původu. Průměrný příjem se pohybuje kolem 200 mg na den, v závislosti na stravovacích návycích. [21]

2.2.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou nejvíce prostudovanou skupinou fenolických látek. Dělí se na anthokyany, flavonoly, katechiny, flavony, flavanony a isoflavony. Jejich společné struktury se skládají ze dvou aromatických kruhů (A a B), které jsou spojeny třemi uhlíky obvykle tvořícími oxidovaný heterocykl (C) (Obr. 7). [26]



Obrázek 7: Obecná struktura flavonoidu

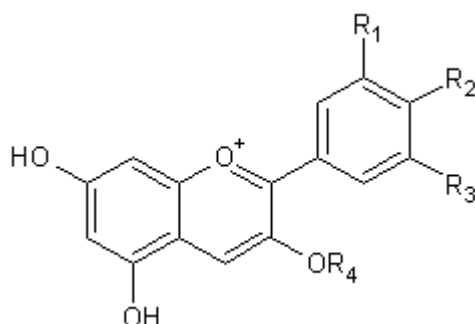
2.2.2.1 Anthokyany

Anthokyany patří mezi významnou skupinu ve vodě rozpustných barviv rostlin. Obecně platí, že čím je ovoce barevnější, tím více obsahuje anthokyanů. Tyto barviva jsou přítomna nejen v plodech, ale i v květech a listech. Barevná škála je široká, od oranžové přes červenou a fialovou až k modré.

Anthokyany se od sebe odlišují počtem hydroxylových skupin substituovaných na struktuře flavonoidu, jejich stupněm methylace a typem a místem glykosylace. Nejběžnějšími substituovanými cukry jsou glukosa, galaktosa, arabinosa, rhamnosa, rutinosa (disacharid glukosy a rhamnosy), sambubiosa (disacharid xylulose a glukosy) a soforosa (disacharid dvou glukos). V bobulích se mohou anthokyany nacházet ve formě mono-, di- nebo triglykosidů nejčastěji substituovaných v poloze 3-C. Na sacharid může být dále navázána alifatická nebo aromatická kyselina (např. kyselina p-kumarová, kávová, ferulová, malonová, octová,...). [29]

Černý rybíz může obsahovat anthokyany v rozmezí 168–613 mg na 100 čerstvých plodů. [30] Nejvíce zastoupenými anthokyany pak jsou kyanidin-3-rutinosid a delphinidin-3-rutinosid. Další anthokyany přítomné v černém rybízu jsou uvedeny v Tab. 9. [31, 32]

Tabulka 9: Anthokyany přítomné v černém rybízu



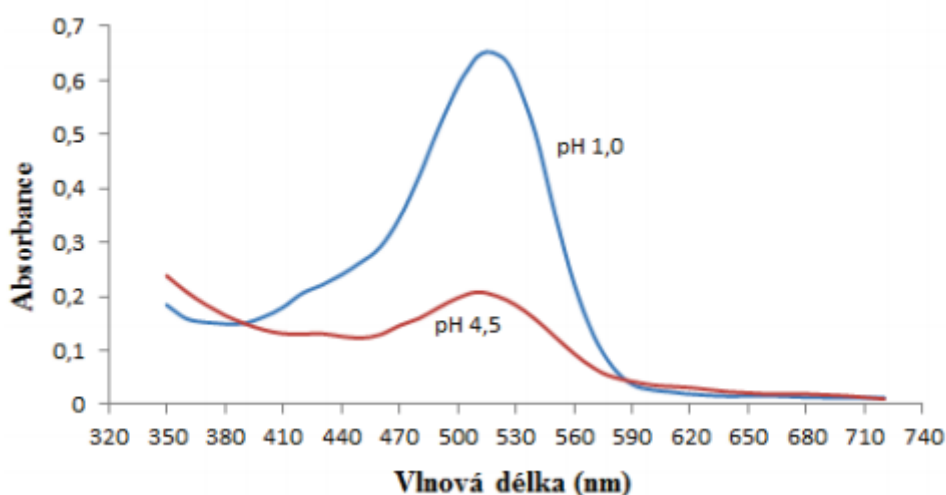
R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Název
OH	OH	H	glukosa	Kyanidin-3-glukosid
OH	OH	H	rutinosa	Kyanidin-3-rutinosid
OH	OH	OH	glukosa	Delfinidin-3-glukosid
OH	OH	OH	rutinosa	Delfinidin-3-rutinosid
OCH ₃	OH	OCH ₃	glukosa	Malvidin-3-glukosid
OCH ₃	OH	OCH ₃	rutinosa	Malvidin-3-rutinosid
H	OH	H	rutinosa	Pelargonidin-3-rutinosid
OCH ₃	OH	H	glukosa	Peonidin-3-glukosid
OCH ₃	OH	H	rutinosa	Peonidin-3-rutinosid
OCH ₃	OH	OH	glukosa	Petunidin-3-glukosid
OCH ₃	OH	OH	rutinosa	Petunidin-3-rutinosid

Anthokyany jsou značně nestabilní látky. Jejich stabilita závisí hned na několika faktorech, jako je pH, skladovací teplota, chemická struktura molekul, koncentrace, světlo, kyslík, rozpouštědla, přítomnost enzymů, dalších flavonoidů, proteinů a kovových iontů. [33]

Ke stanovení anthokyanů se často používá UV/VIS spektrofotometrie, kvůli její jednoduchosti a nízkým provozním nákladům. Nákladnější technikou je pak vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV nebo hmotnostním detektorem.

Princip stanovení celkových anthokyanů pomocí pH diferenciální metody

Tato metoda spadá pod UV/VIS spektrofotometrické stanovení celkových monomerních anthokyanů. Metoda je založená na reversibilních strukturních změnách anthokyanů v závislosti na změně pH prostředí. Tato reakce se zásadně projeví na absorpčním spektru (Obr. 8). Při pH prostředí 1,0 převládá barevná oxoniová forma, zatímco bezbarvá hemiketalová forma převládá při pH 4,5. pH diferenciální metoda umožňuje rychlé a přesné měření i za přítomnosti polymerizovaných, degradovaných pigmentů a dalších rušivých sloučenin. [34]



Obrázek 8: Absorpční spektrum anthokyanů v černém rybízu [35]

Stanovení anthokyanů pomocí HPLC s UV detektorem

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie nejčastěji používá ke stanovení anthokyanů UV/VIS detektor nebo detektor s diodovým polem (DAD). Anthokyanů mají specifické absorpční maximum při vlnové délce 520 nm. Což znamená, že je při stanovení neruší přítomnost dalších flavonoidů ve vzorku. Při použití detekce s diodovým polem systém provádí kompletní sken každého píku, což může být využito při identifikaci anthokyanů. [36]

Stanovení anthokyanů pomocí HPLC s hmotnostním detektorem

Spojení HPLC-MS (vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem) je určeno pro kvantitativní i kvalitativní stanovení anthokyanů. Mezi vhodné ionizační techniky pro anthokyanů patří ionizace laserem za přítomnosti matice (MALDI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a ionizace elektrosprejem (ESI). Tímto způsobem se vytvoří plynné ionty, které dávají velmi zjednodušená spektra. Jako analyzátor je možné použít magnetický, průletový (TOF), kvadrupólový analyzátor nebo iontovou past. [36]

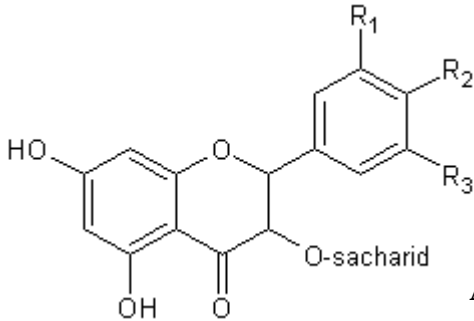
2.2.2.2 Flavonoly

Obecně jsou flavonoly přítomny v potravinách v relativně nízkých koncentracích, cca 1,5–3,0 mg na 100 g čerstvé hmotnosti. Flavonoly jsou přítomny v potravinách jako glykosidy. [37]

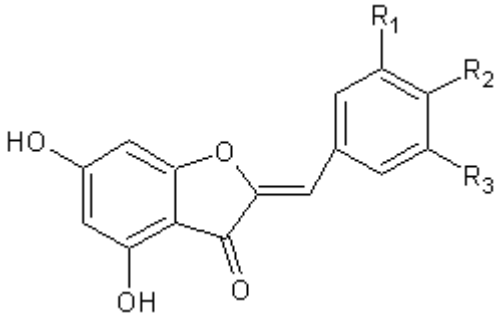
Mezi nejvíce zastoupené flavonoly v černém rybízu patří deriváty myricetinu a kvercetinu. V menším množství jsou zastoupeny také deriváty kemferolu, isorhamnetinu a aureusidinu. Struktura těchto derivátů je uvedena v Tab. 10. 75 % celkového obsahu flavanolů v černém rybízu tvoří glykosidy a rutinosidy myricetinu a kvercetinu. [38]

Černý rybíz obsahuje 8,9–24,5 mg·100 g⁻¹ myricetinu, 5,2–12,2 mg·100 g⁻¹ kvercetinu a 1,2–2,2 mg·100 g⁻¹ kemferolu. [39]

Tabulka 10: Flavonoly v černém rybízu



A

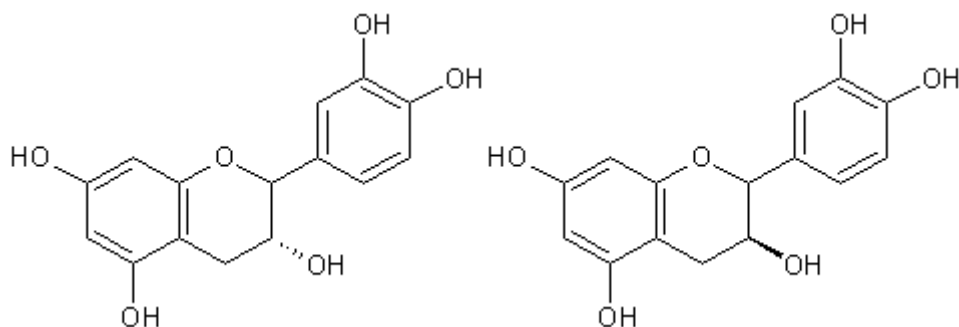


B

Typ	R ₁	R ₂	R ₃	Název
A	OH	OH	OH	Myricetin
A	OH	OH	H	Kvercetin
A	H	OH	H	Kemferol
A	OCH ₃	OH	H	Isorhamnetin
B	OH	OH	H	Aureusidin

2.2.2.3 Katechiny

Katechiny neboli flavan-3-oly obsahují dvě centra chiralit, proto mohou existovat 4 jejich izomery. V bobulovitém ovoci se nejčastěji vyskytují dva izomery, a to jsou (–)-epikatechin a (+)-katechin (Obr. 9). Katechiny se mohou vyskytovat jako monomery, nebo jako oligomerní či polymerní sloučeniny, které poté tvoří kondenzované taniny. [40]



Obrázek 9: Vlevo (–)-epikatechin a vpravo (+)-katechin

2.2.2.4 Flavony

Flavony jsou méně časté v ovoci a zelenině. Mezi hlavní zástupce patří apigenin a luteolin, což jsou O-glykosidy flavonů. Jejich jedlými zdroji jsou celer a petržel. V obilovinách (proso, pšenice) jsou přítomny C-glykosidy flavonů a v kůře citronu jsou obsaženy flavony s vysokým stupněm esterifikace methylovou skupinou (např. tangeretin, nobiletin a sinensetin). Tyto vícenásobně esterifikované flavony jsou nejvíce hydrofobními flavonoidy. [37]

2.2.2.5 Flavanony

Hlavními zástupci flavanonů jsou naringerin, hesperetin a jejich glykosidy. Tyto látky se vyskytují v grepech a pomerančích. V experimentech na zvířatech in vitro bylo dokázáno, že

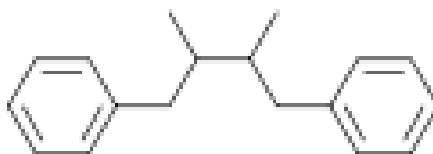
mají široké spektrum biologické aktivity (antioxidační, hypocholesteromická a hypoglykemická aktivita, prevence proti nádorům a ztrátě kostní hmoty). [41–43] Což znamená, že mohou mít potenciálně příznivé účinky i na lidské zdraví. [44]

2.2.2.6 Isoflavony

Méně rozšířená skupina isoflavonů byla prokázána ve vyšším množství pouze v rostlinné čeledi bobovitých (hlavně sójové boby). Patří mezi fytoestrogeny (látky s estrogenními účinky, které se nacházející v rostlinách) a v poslední době jsou hodně studované. Studie prozkoumávají především účinky na příznaky menopauzy (návaly horkosti, osteoporózu), kardiovaskulární funkce a regulaci menstruačního cyklu. Výsledky nejsou zatím jednoznačné, protože některé studie ukazují pozitivní účinky a jiné naopak žádné účinky neprokázaly. [44–46]

2.2.3 Lignany

Lignany jsou řazeny mezi tzv. fenylpropanoidy, které tvoří rozsáhlou skupinu sekundárních metabolitů, díky jejich strukturní variabilitě a širokému rozsahu biologických účinků. Lignany tvoří dimery vzniklé spojením dvou fenylpropanových jednotek způsobem C₆-C₃-C₃-C₆ (Obr. 10). Stejnou strukturu má polymer fenylpropanových jednotek – lignin. Lignany spolu s ligninem chrání rostlinu proti patogenům. Uplatňují se jako fytoestrogeny, antioxidanty a antikarcinogenní látky. [47]



Obrázek 10: Obecná struktura lignanu

2.2.4 Tanniny

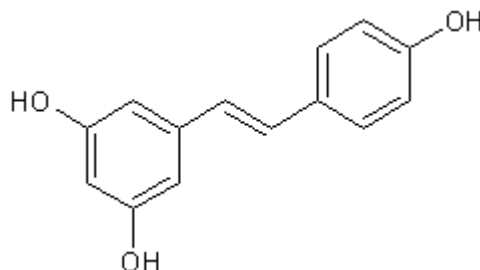
Tanniny neboli třísloviny jsou látky s vysokým stupněm hydroxylace, které mohou tvořit komplexy se sacharidy a proteiny. Při jídle potravin bohatých na tanniny vnímáme svíravou (trpkou) chuť, protože se tanniny srážejí s proteiny slin. [48]

Tanniny můžeme rozdělit na hydrolyzované a kondenzované. Hydrolyzované tanniny jsou vícenásobné estery gallové nebo ellagové (dimer gallové kyseliny vzniklý kondenzací) kyseliny s vázanou glukosou. Produkty jejich oxidačních reakcí jsou známy jako gallotanniny a ellagotanniny. Kondenzované tanniny neboli proanthokyanidiny jsou oligomery nebo polymery dvou nebo více katechinů. Obsahují několik podskupin, které se liší stereochemií a stupněm hydroxylace. [26] Polymerní proanthokyanidiny mohou obsahovat i 50 a více jednotek. Nejběžnější jsou však proanthokyanidiny s molekulovou hmotností kolem 5 kDa. [48]

2.2.5 Stilbeny

Další podskupinou fenolických látek jsou stilbeny. Jejich strukturní skelet obsahuje dva benzenové kruhy spojené dvěma uhlíky. Hlavním zástupcem stilbenů je resveratrol. V rostlinách se nachází v cis i trans formě, ale pouze trans-resveratrol (Obr. 11) je biologicky aktivní. Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilben) se vyskytuje především ve slupkách ovoce, např. v červených hroznech, moruších a černém rybízu. [49] V černém rybízu se trans-resveratrol nachází ve velmi malém množství, a to kolem 0,015 mg na 1 g sušiny. [50] Dalšími zástupci

stilbenů jsou pterostilben a piceatanol, které byly nalezeny v malém množství v borůvkách, brusinkách a jahodách. [26]



Obrázek 11: *trans-resveratrol*

Stilbeny mají fungistatické vlastnosti, to znamená, že dokážou redukovat růst plísní, a některé dokonce působí na plísně toxicky. Dále mají estrogenní účinky, které mohou být využity při prevenci proti degračním změnám vlasových žláz a folikul. [49]

2.2.6 Faktory ovlivňující obsah fenolických látek

Hned několik faktorů může ovlivnit obsah fenolických látek, např. prostředí, v němž se rostlina pěstuje, skladování a průmyslové nebo domácí zpracování.

Zásadní vliv na obsah fenolických látek mají klimatické (sluneční svit, srážky) a agronomické (typ půdy, odrůda, výnos ovoce, apod.) podmínky prostředí. Sluneční svit má pozitivní vliv na většinu flavonoidů. Fenolické látky, hlavně fenolické kyseliny, se podílejí na odezvě rostlin na různé druhy namáhání (léčení poškozených tkání díky antimikrobiálním vlastnostem). V dnešní době není možné určit klíčové proměnné, které jsou zodpovědné za variabilitu obsahu fenolických látek. K tomuto by bylo zapotřebí obrovské množství analýz. [37]

Při skladování dochází ke změnám barvy, organoleptických vlastností a tedy i obsahu fenolických látek vlivem jejich oxidace. Výsledky skladování pšeničné mouky ukázaly výrazný úbytek fenolických kyselin (o 70 % nižší koncentrace za 6 měsíců). [37] Jiná studie dokázala, že skladování v chlazeném skladu nemá zásadní vliv na obsah fenolických látek v jablkách. [51]

Při zpracování ovoce a zeleniny často dochází k loupání slupek. Tímto způsobem se odstraňuje podstatná část fenolických látek. Při strouhání či rozměňování matric může dojít k oxidaci fenolických látek, které poté mění barvu (hnědnou). Nežádoucí hnědnutí zamezí stabilizační kroky zaměřené na odstranění některých flavonoidů. Vaření může mít také vliv na obsah. Vaření v páře je výhodné, neboť nedochází k vyplavování fenolických látek. [37] Při 15 minutovém varu ztratí cibule a rajčata až 80 % obsahu kvercetinu. [52]

2.2.7 Metody stanovení fenolických látek

Metody pro stanovení celkových fenolických látek jsou většinou založené na oxidačně-redukčních vlastnostech. Fenolické látky fungují jako redukční činidla. Nejpoužívanější metodou pro stanovení celkových fenolických látek je spektrofotometrické stanovení podle Folin-Ciocalteu (FCM). Existují další spektrofotometrické metody pro posouzení obsahu fenolických látek, jako je metoda podle Price a Butlera (PBM), metoda s použitím aminoantipyrinu (AAPM) a metoda redukce mědi (CUPRAC). [53]

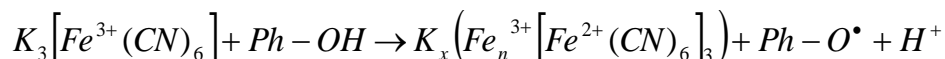
Pro stanovení jednotlivých fenolických látek se nejčastěji používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) s různými možnostmi detekce, jako UV-VIS detekce, detekce s diodovým polem (DAD) a hmotnostní detekce (MS). Mezi historické metody patří papírová chromatografie (PC) a chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Méně používané metody jsou kapilární plynová chromatografie (CGC) a kapilární zónová elektroforéza (CZE).

2.2.7.1 Metoda FCM

Tato metoda je jednoduchá, levná a má širokou použitelnost pro různé vzorky (rostlinné šťávy a extrakty). Folin-Ciocalteuovo činidlo je čirý žlutý roztok připravený z wolframanu sodného, molybdenanu sodného, koncentrované kyseliny chlorovodíkové, kyseliny fosforečné, síranu lithného a destilované vody. [54] Reakce je založena na oxidaci fosfowolframát-fosfomolybdenátovém komplexu pomocí fenolických látek. Vznikají tak modré produkty reakce, jejichž množství je přímo úměrné množství přítomných fenolických látek. [55] Folin-Ciocalteuovo činidlo reaguje s širokým spektrem sloučenin, proto je absorpční pík široký a pro analýzu lze použít široký rozsah vlnových délek. Nejčastěji používané vlnové délky jsou 750, 760 a 765 nm. Kalibrační křivka se často tvoří pomocí kyseliny gallové. Výsledek koncentrace fenolických látek se pak vyjadřuje jako ekvivalent kyseliny gallové (GAE). [56]

2.2.7.2 Metoda PBM

Metoda je založena na přidání hexakynoželezitanu draselného k roztoku vzorku spolu s chloridem železitým. Při této reakci dochází k oxidaci fenolátového aniontu na fenolátový radikál a zároveň dochází k redukci hexakynoželezitanu na hexakynoželezitan.



Zelená barva se touto reakcí mění na modrou, díky vzniku Berlínské modři. Absorbance je měřena při vlnové délce 720 nm. Jako standard se používá kyselina gallová. Výsledek koncentrace fenolických látek se vyjadřuje jako ekvivalent kyseliny gallové (GAE). [57]

2.2.7.3 Metoda AAPM

Metoda je odlišná od předchozích metod (FCM a PBM) v reakčním mechanismu. Dochází zde k tvorbě komplexu mezi fenolickými látkami a 4-aminoantipyrinem v přítomnosti oxidačního činidla (např. hexakynoželezitan nebo peroxodisulfát). Vzniklý barevný komplex má chinonovou strukturu, proto je tato reakce omezena jen pro fenolické látky, které jsou schopné tvořit chinonové struktury. Absorbance barevného komplexu je měřena při vlnové délce 470 nm. Jako standard se také používá kyselina gallová a výsledky koncentrace se vyjadřují jako GAE. [58]

Ve studii Stratila a kol. (2006) se zabývali porovnáním metod PBM a AAPM pro stanovení fenolických látek. Výsledky získané metodou AAPM byly obecně o více než polovinu nižší než u metody PBM. [55]

2.2.7.4 CUPRAC metoda

Princip metody spočívá v redukci Cu^{2+} iontů na Cu^+ ionty v hydroethanolickém prostředí při pH 7 a v přítomnosti činidla neocuproinu (2,9-dimethyl-1,10-fenantrolin). Neocuproin tvoří s Cu^+ barevné komplexy. Absorbance těchto barevných komplexů je měřena při vlnové délce 450 nm. Jako standard se používá kyselina gallová nebo tříslová. Výsledky jsou poté vyjádřeny jako příslušné ekvivalenty. Citlivost CUPRAC metody je 1,5 x vyšší než metody FCM. [59, 60]

2.2.7.5 *Historické a méně používané metody*

Do této skupiny patří papírová chromatografie (PC), která využívá jako stacionární fázi chromatografický papír. TLC využívá jako stacionární fázi silikagel, celulosu nebo polyamid nanesený v tenké vrstvě na podložku. Hydrofilní flavonoidy jsou separovány TLC s polyamidem nebo mikrokrystalickou celulosou. Méně hydrofilní flavonoidy (flavony a isoflavony) lze separovat na silikagelu. Detekce je prováděna pomocí reakcí s činidly, ze kterých vznikají barevné nebo fluoreskující komplexy. Jejich nevýhodami jsou omezená možnost kvantifikace a nízká výtěžnost. [61]

U plynové chromatografie je problémem nízká těkavost fenolických látek. Z tohoto důvodu je vhodná pouze pro stanovení jednoduchých fenolických kyselin a nízkomolekulárních flavonoidů. Před analýzou je nutná derivatizace hydroxylových skupin na etherové nebo esterové skupiny. Pro vlastní stanovení se používají kapilární kolony vyrobené z taveného křemene o délce 25–30 m, vnitřním průměru 0,25–0,5 mm a tloušťce stacionární fáze 0,25 μm . Příkladem stacionární fáze může být polysiloxanový materiál s 95 % methylových a 5 % fenylových substituentů. Jako detektor se používá MS s elektrochemickou ionizací. [61]

CZE patří mezi elektromigrační techniku, která je založena na pohybu nabitých analytů v roztoku působením vnějšího elektrického pole. V tomto případě jde o techniku separace v kapiláře (s průměrem 50–100 μm) na základě rozdílných elektroforetických mobilit. Nenabitě analyty jsou unášeny elektroosmotickým tokem a nejsou separovány. CZE je vysoce účinná metoda a dokonce u ní lze dosáhnout lepší selektivity v porovnání s HPLC. Nejčastěji se touto technikou analyzují fenolické kyseliny, resveratrol, flavonoly, katechiny a jiné flavonoidy. Jako detektory lze použít UV/VIS detektor, DAD detektor nebo MS detektor. [61, 62]

2.2.7.6 *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC*

Nejpoužívanější metodou pro stanovení fenolických látek je HPLC na reverzní fázi (RP-HPLC). To znamená, že stacionární fáze je méně polární než mobilní fáze. Jako stacionární fáze se téměř výhradně používá silikagel modifikovaný nepolárními skupinami C18 (oktadecylovými). Méně často se používají C8 (oktylové) nebo fenylové skupiny. Mobilní fáze bývá na bázi binárních až ternárních směsí vodných roztoků kyseliny octové, mravenčí nebo fosforečné s methanolem, acetonitrilem nebo tetrahydrofuranem. Používá se gradientová i izokratická eluce. Volba mobilní fáze závisí na druhu použité stacionární fáze. Retenční poměry se dají ovlivnit změnou pH (př. zvýšením pH mobilní fáze se zvyšují retenční časy zásaditých látek a naopak se snižují retenční časy kyselých látek). [61, 63]

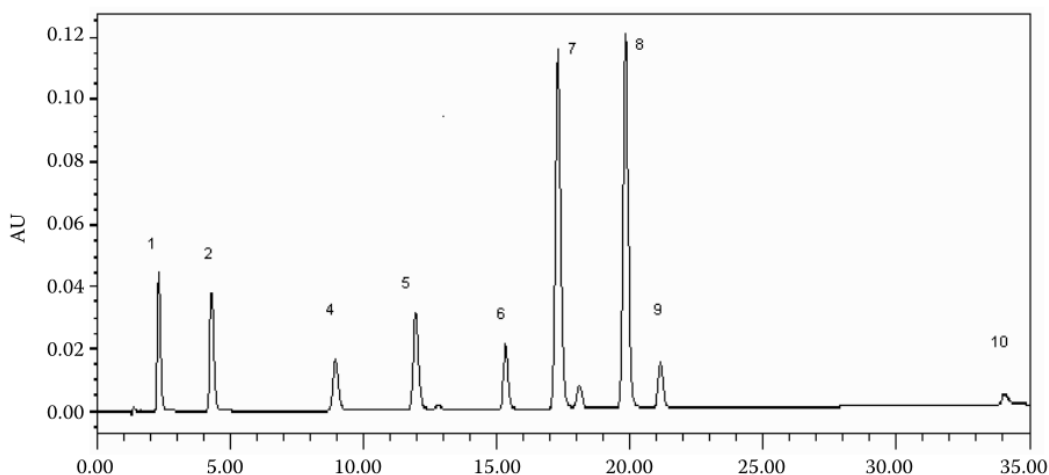
Za obvyklých podmínek analýzy na RP-HPLC jsou nejdříve eluovány nejvíce polární látky, tedy diglykosidy předcházejí monoglykosidy, a ty předcházejí aglykony. Pro stejně substituované fenolické látky klesá intenzita interakce k mobilní fázi v pořadí flavanony, flavonoly a flavony. Pro chování anthokyanů je klíčový charakter substituce B kruhu struktury flavonoidu (Obr. 7), protože je určeno celkovou polaritou a stereochemií sloučeniny. Pořadí eluce je následující: delfinidin < kyanidin < petunidin < pelargonidin < peonidin < malvidin. Glykosylace pak navíc snižuje retenci: 3,7-diglykosidy < 3,5-diglykosidy < 3-glykosidy a 3-galaktosidy < 3-glukosidy < 3-rutinosidy. Acetylace cukerných složek snižuje mobilitu látek. [61]

Nejběžnějšími detektory jsou:

- *UV/VIS detektor* vyhodnocuje absorbanci eluátu v měrné cele. Zdrojem záření bývá deuteriová lampka pro UV oblast a halogenová zářivka pro viditelnou oblast. Nevýhodou tohoto detektoru je možnost nastavit pouze jednu vlnovou délku v daný

čas. Anthokyany lze měřit při rozmezí 515–520 nm. Ostatní flavonoidy vykazují často dvě hlavní skupiny absorpčních pásů, a to 320–385 nm díky absorpci B kruhu a 250–285 nm díky absorpci A kruhu. [61]

Vlnová délka lze v průběhu analýzy měnit. Příkladem je Obr. 11, na kterém je uveden chromatogram analýzy některých fenolických látek v pivu. Vlnová délka byla měněna podle eluované látky. Pro kvercetin, gallovou kyselinu, protokatechinovou kyselinu, (+)-katechin a (–)-epikatechin byla nastavena vlnová délka 280 nm, pro kávovou, p-kumarovou a salicylovou kyselinu bylo nastaveno 306 nm, a pro gentisovou kyselinu 330 nm. [64]



Obrázek 12: Chromatogram: 1 – gallová kyselina, 2 – protokatechinová kyselina, 3 – gentisová kyselina, 4 – katechin, 5 – kávová kyselina, 6 – epikatechin, 7 – p-kumarová kyselina, 8 – ferulová kyselina, 9 – salicylová kyselina, 10 – kvercetin

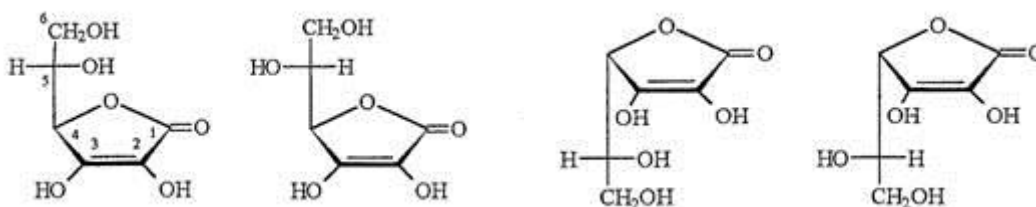
- *detektor s diodovým polem (DAD)* je schopný tvořit spektra látek v širokém rozsahu vlnových délek. Proto je dnes využívanější než klasický UV/VIS detektor. Detektor je možné použít i k charakterizaci stanovovaných látek. Ve výsledném chromatogramu lze totiž vidět retenční chování na koloně i spektrální vlastnosti.
- *fluorimetrický detektor (FD)* je omezen pouze pro látky, které jsou schopné přirozeně fluoreskovat nebo jsou schopné fluoreskovat po vhodné reakci. FD měří sekundární záření (emisní), které látka vyzáří po absorpci primárního elektromagnetického záření (excitační). Emitované záření je detekováno pomocí fotonásobiče. Pro měření je nutné nastavit obě vlnové délky (excitační a emisní). Takto lze detekovat celkové flavonoly (volný a konjugovaný myricetin, kvercetin, kemferol a isorhamnetin) při excitační vlnové délce 425 nm a emisní vlnové délce 480 nm. [61, 63]
- *hmotnostní detektor (MS)* je univerzální a vhodný pro identifikaci všech fenolických látek v potravinách. Nevýhodou jsou vysoké pořizovací a provozní náklady.

2.3 Vitamin C

Vitamin C neboli kyselina askorbová (AA) je ve vodě rozpustná látka populární pro její antioxidační vlastnosti. Lidé si neumí vitamin C syntetizovat, na rozdíl od většiny zvířat, proto si ho musí doplnit stravou. Bylo zjištěno, že příčinou neschopnosti syntetizovat si vitamin C, je absence aktivního enzymu – L-gulono-lakton oxidasy. AA byla poprvé izolována v roce 1928 maďarským biochemikem Albertem Von Szent Györgyiem, který za její objev dostal v roce 1937 Nobelovu cenu. AA je nestabilní a lehce oxidovatelná kyselina, jejichž struktura může být poškozena kyslíkem, zásadami a vysokou teplotou. [65, 66]

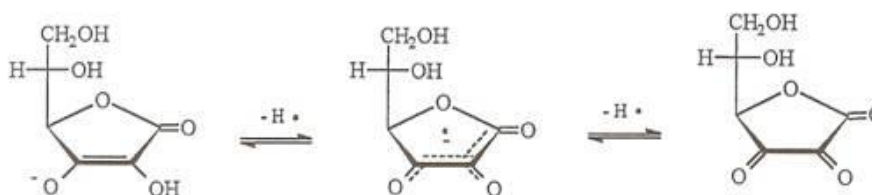
2.3.1 Struktura

Vitamin C se svou strukturou řadí mezi deriváty sacharidů – kyseliny. Vitamin C obsahuje dva chirální uhlíky (C-4 a C-5), proto tvoří čtyři stereoizomery. Avšak biologickou aktivitu vykazuje pouze L-askorbová kyselina (γ -lakton L-threo-hex-2-enonové kyseliny). Její isomer D-askorbová kyselina a druhý pár enantiomerů, L- a D-isoaskorbová kyselina, se chemickou chovají stejně, ale nevykazují biologickou aktivitu vitaminu C. Všechny čtyři stereoisomery jsou uvedeny na Obr. 13. Vitamin C obsahuje na C-2 a C-3 endiolové uspořádání, což mu dává silné redukční účinky. [63]



Obrázek 13: Zleva – L-askorbová kyselina, D-isoaskorbová kyselina, D-askorbová kyselina a L-isoaskorbová kyselina

Názvem vitamin C se označuje celý reversibilní redoxní systém: L-askorbová kyselina, produkt její jednoelektronové oxidace – L-askorbylradikál a produkt její dvouelektronové oxidace – L-dehydroaskorbová kyselina (DHAA), viz Obr. 14. V roztocích o fyziologickém pH se L-askorbová kyselina a L-askorbylradikál vyskytují jako anionty. [63]



Obrázek 14: Zleva – L-askorbová kyselina, L-askorbylradikál a L-dehydroaskorbová kyselina

2.3.2 Biologická aktivita

Vitamin C má v těle množství biochemických a fyziologických funkcí, které jsou závislé na jeho redukční schopnosti v reakcích.

AA napomáhá metabolismu tyrosinu, listové kyseliny a tryptofanu. Také pomáhá metabolismu cholesterolu tak, že zvyšuje jeho eliminaci, čímž snižuje jeho množství v krvi. [65]

AA hraje důležitou roli při tvorbě a udržování kolagenu, který reprezentuje kolem jedné čtvrtiny proteinů v těle. Kolagen je hlavní pojivová tkáň nacházející se v kůži, vazivech,

chrupavkách, kloubech, stěnách cév, kostech a zubech. Biosyntéza prokolagenu (prekurzor kolagenu) vyžaduje AA pro maximální aktivitu dvou zapojených enzymů (prolin hydroxylasy, lysin hydroxylasy). Nedostatek vitamínu C zhoršuje syntézu kolagenu. [65, 67]

AA je kofaktor mnoha biochemických reakcí katalyzovaných různými typy oxygenas. Funguje jako donor elektronů s redoxním potenciálem, který redukuje iont kovu v aktivním centru oxygenasy a udržuje iont kovu v redukovaném stavu pro optimální aktivitu enzymu. AA je esenciální pro syntézu aminokyseliny karnitinu, jako kofaktor dvou dioxygenas zapojených do syntézy karnitinu. Dále je AA kofaktorem biosyntéz katecholaminů, zvláště přeměny dopaminu na noradrenalin katalyzovanou dopamin β -monooxygenasou. [67] Karnitin a katecholaminy jsou důležité pro regulaci nervového systému. [65] Existuje několik dalších enzymů, jejichž aktivita je závislá na AA, včetně oxygenas zapojených do syntézy peptidů. Tyto oxygenasy jsou nezbytné pro maximální aktivitu hormonů (oxytocin, vasopresin, cholecystokinin) a hydroxylaci fenylalaninu za tvorby tyrosinu. [67]

Normálně je absorpce železa v těle velmi špatná. Člověk tak riskuje anémii způsobenou nedostatkem železa. Absorpce železa, zejména nehemového, které se nachází v rostlinách a pitné vodě, se zlepšuje díky AA. [65]

Primární role AA jako antioxidantu je zhasení volných radikálů. Jako ve vodě rozpustný antioxidant může pracovat vně i uvnitř buňky. AA snadno vychytává reaktivní formy kyslíku a dusíku. Volné radikály vyhledávají elektronové páry, které poskytuje AA, aby obnovily svou stabilitu. Jedno nebo dvouelektrodové produkty oxidace AA se dají jednoduše regenerovat glutationem, NADH nebo NADPH. Zároveň AA může regenerovat urát, glutation, β -karoten a vitamin E (antioxidant v lipidech). AA hlavně zabráňuje poškození DNA, plic, nervového systému a spermií způsobené volnými radikály. [65, 67]

AA také bojuje proti rozšíření polutantů životního prostředí (oxid uhelnatý, pesticidy, těžké kovy) v těle stimulací enzymů v játrech. [65]

Vitamin C má antihistaminový efekt. Osoby s nízkou hladinou AA v krvi mají zvýšenou hladinu krevního histaminu a doplněním AA se tato hladina snižuje. [65]

2.3.3 Fyziologie a výživa

V lidském těle dochází k absorpci AA v ústní sliznici, žaludku a tenkém střevě. V ústech je absorpce zprostředkována pasivní difúzí. V gastrointestinálním traktu (GIT) probíhá absorpce aktivním přenašečovým transportem. Kyselina dehydroaskorbová je přes buněčnou membránu přepravována rychleji a poté je v buňkách epitelu redukována na AA. [65]

V plasmě je vitamin C transportován ve formě volného aniontu – askorbátu. Pro transport nebyl identifikován specifický vazebný protein. [67]

Askorbát a jeho metabolity jsou vylučovány hlavně močí. Pokud člověk přijme větší množství AA, dojde k vyloučení přebytečného množství močí. Tímto způsobem je zabráněno předávkování. Neabsorbovaný vitamin C může být nalezen i ve stolici, ale nic nenasvědčuje tomu, že by tato cesta vylučování byla důležitá. [67]

Podle Směrnice č. 2008/100/EC je doporučená denní dávka (DDD) vitamínu C pro zdravého dospělého člověka 80 mg. [13] V roce 2013 vytvořila EFSA (European Food Safety Authority) studii zaměřenou na vědecké stanovisko k doporučené denní dávce vitamínu C. V ní jsou

uvedeny hodnoty DDD pro různé skupiny obyvatel v EU. EFSA doporučila navýšit hodnoty DDD (Tab. 11), proto je možné, že v dohledné době dojde k aktualizaci směrnice. [67]

Tabulka 11: DDD vitaminu C dle EFSA

Věk	DDD (mg/den)	
	Muži	Ženy
7–11 měsíců	20	20
1–3 roky	20	20
4–6 let	30	30
7–10 let	45	45
11–14 let	70	70
15–17 let	100	90
18 a více let	110	95
těhotenství	-	+ 10
kojení	-	+ 60

Dlouhodobý nedostatek (avitaminóza) vitaminu C způsobuje onemocnění zvané kurděje (neboli skorbut). Symptomy se vztahují k vadám pojivových tkání, které vznikají díky oslabení kolagenních struktur. U kojenců se mohou vyskytovat i vady kostní tkáně, které mohou způsobit poruchy růstu kostí a osifikaci (kostnatění). U dospělých jsou kurděje spojeny se ztrátou zubů, bolestí kloubů, kostí a svalů. Dále dochází k špatnému hojení ran, vzniku podlitin a zánětů a krvácení z dásní. Mezi prvotní symptomy kurdějí patří únava, letargie, chudokrevnost, bolestí kloubů a svalů. Dnes je tato choroba poměrně vzácná. [67]

Krátkodobý nedostatek (hypovitaminóza) vitaminu C způsobuje celkovou oslabenost organismu. Jeho příznaky nejsou specifické. Toto celkové oslabení může vést k snížení imunity, a tím k infekcím způsobenými bakteriemi, plísněmi, viry nebo rickettsiemi. Lze tedy konstatovat, že vitamin C podporuje imunitu a odolnost organismu (antioxidační vlastnosti), a tím snižuje riziko onemocnění (nachlazení, chřipka, ateroskleróza, rakovina). [65]

K hypervitaminóze normálně nedochází, protože se nadbytečná množství AA vylučují močí, jak už bylo zmíněno. Zřídka se mohou vyskytnout ledvinové kameny nebo průjem vlivem hypervitaminózy. Nadbytek AA v moči může dávat falešně pozitivní výsledky na cukr. [65]

Látky, které ruší funkci nebo absorpci vitaminu se nazývají antivitaminy. Za antivitamin C se považují oxidoreduktázy – askorbát oxidasa, askorbát peroxidasa, dehydroxyaskorbát reduktasa a superoxiddismutasa. Hladinu vitaminu C v těle snižuje také kouření. [68]

Vitamin C se ve větších množstvích vyskytuje především v ovoci a zelenině. Již dříve byl zmíněn obsah AA v černém rybízu a dalších druzích ovoce (Tab. 5). Další hodnoty obsahu AA v ovoci, zelenině a bylinkách jsou uvedeny níže (Tab. 12). V některých potravinách nejsou hladiny AA vysoké (např. brambory), ale člověk jich spotřebuje větší množství. Živočišné játra, ledviny a některé další živočišné tkáně také obsahují AA. [67] Velmi malé množství AA je také přítomno v rybách a v mléce. [65] Obsah AA v těchto minoritních zdrojích je uveden v Tab. 13.

Tabulka 12: Srovnání obsahu AA v ovoci a zelenině [11]

Druh ovoce	Obsah AA (mg/100 g)	Druh zeleniny nebo bylinek	Obsah AA (mg/100 g)
kiwi	92,7	červená paprika	191,0
jahody	66,6	petrželová nať	178,5
pomeranče	50,7	brokolice	121,0
grapefruit	42,8	křen	117,0
mango	38,0	zelená paprika	104,1
angrešt	29,7	růžičková kapusta	95,2
ananas	20,6	květák	76,8
ostružiny	17,9	kopr	70,1
borůvky	16,2	špenát	60,0
banány	14,3	sušený tymián	50,0
meruňky	10,5	pažitka	48,9
třešně	10,1	pórek	25,0
višně	8,9	rané brambory	23,2
broskve	6,6	kmín	21,0
nektarinky	5,4	zimní brambory	19,2

Tabulka 13: Srovnání minoritních zdrojů AA [11]

Druh potravin	Obsah AA (mg/100 g)	Druh potravin	Obsah AA (mg/100 g)
telecí játra	33,8	hovězí srdce	5,0
hovězí játra	31,0	vepřové srdce	4,6
vepřová játra	27,6	vepřový jazyk	4,3
kuřecí játra	23,0	maso kapra	1,3
kuřecí drůbky	16,2	plnotučné mléko	1,2
hovězí ledviny	11,9	nízkotučné mléko	1,1
vepřové ledviny	10,8	syrový losos	1,0

2.3.4 Použití

Čistá kyselina L-askorbová je bílá krystalická látka využívaná v potravinářském průmyslu zejména pro své antioxidační vlastnosti. Tím zlepšuje senzorické vlastnosti produktu a také redukuje množství volného kyslíku.

Kyselina L-askorbová se nejčastěji používá při zpracování ovoce a zeleniny, dále v pekařském, pivovarském, mlékařském a masném průmyslu. V pekařském průmyslu pomáhá zpracování mouky tím, že urychluje zrání mouky a tím snadnějšímu zpracování těsta.

Dle české legislativy, vyhlášky č. 4/2008 Sb. ve znění pozdějších předpisů, je povoleno používat jako přídatné látky kyselinu L-askorbovou (E 300), askorbát sodný (E301), askorbát vápenatý (E 304) a estery mastných kyselin askorbové kyseliny (E 304) – konkrétně askorbylpalmitát a askorbylstearát. [69]

Kyselina L-askorbová se může použít do ovocných a zeleninových šťáv, nektarů, džemů, rosolů, marmelád a podobných výrobků z ovoce včetně těchto výrobků se sníženým obsahem energie; zahuštěného mléka; neemulgovaných olejů a tuků živočišného či rostlinného původu;

zmrazeného a nezpracovaného ovoce a zeleniny, chlazeného a nezpracovaného ovoce a zeleniny, loupaných brambor, ovocných kompotů; čerstvých nebo mražených ryb, korýšů a měkkýšů; sterilovaného ovoce a zeleniny ve sklenicích a plechovkách; chleba; čerstvých těstovin; piva; dle vyhlášky č. 4/2008 Sb. ve znění pozdějších předpisů. Pro tyto výrobky nejsou stanoveny limity. [69]

Pro výrobu potravin určených pro výživu kojenců a malých dětí jsou stanoveny množství limity a je přesně specifikováno, která přídatná látka se může použít, dle vyhlášky č. 4/2008 Sb. ve znění pozdějších předpisů. Při výrobě počáteční kojenecké výživy je možné použít L-askorbylpalmitát v množství do 10 mg/l, to samé platí u výroby pokračovací kojenecké výživy. Kyselina L-askorbová, askorbát sodný a vápenatý se mohou použít do šťáv, nápojů na bázi ovoce a zeleniny a ostatních příkrmů do 300 mg/l jednotlivě nebo v kombinaci jako askorbová kyselina, nebo se mohou použít do obilných příkrmů včetně sušenek a sucharů s obsahem tuku do 200 mg/l jednotlivě nebo v kombinaci jako askorbová kyselina. L-askorbylpalmitát se může přidat do obilných příkrmů, sušenek, sucharů s obsahem tuku a ostatních příkrmů do 100 mg/l. [69]

Kyselina L-askorbová byla do nedávna průmyslově vyráběna Reichstein-Grüssnerovou syntézou, která byla navržena v roce 1933. V této syntéze byl D-sorbitol převeden na kyselinu L-askorbovou přes 2-keto-L-gulonovou kyselinu za použití biooxidace *Gluconobacterem oxydans* a několika chemických kroků. V současné době jsou používány další biooxidační kroky pomocí *Ketogulonicigenium vulgare*, který převede D-sorbitol na 2-keto-L-gulonovou kyselinu bez chemických kroků. V poslední době byly identifikovány nové enzymy, které generují kyselinu L-askorbovou přímo oxidací L-sorbose. [70]

2.3.5 Stanovení vitamínu C

Pro získání správných výsledků je důležité vybrat vhodnou analytickou metodu. Existuje mnoho způsobů stanovení vitamínu C. Obsah vitamínu C se používá jako jeden z faktorů při porovnávání kvality ovoce, proto se zvýšil zájem o simultánní analýzu kyseliny askorbové (AA) a dehydroaskorbové (DHAA) v potravinách. Obě kyseliny se liší vlastnostmi, proto je obtížné stanovit je dohromady. Největšími problémy simultánní analýzy jsou selektivita a citlivost metody, výběr interních standardů, retence AA a DHAA, výběr vhodného detektoru a stabilita kyselin v roztoku. Ke stanovení celkového vitamínu C je většinou zapotřebí redukovat DHAA na AA pomocí redukčních činidel. [71]

Metody založené na reverzibilní redoxní reakci oxidované AA/redukované DHAA nezajišťují specifickou a podléhají interferenci dalších redukčních činidel. Jedná se především o spektrofotometrické a enzymatické metody, které by mohly interferovat s analyty – ionty železa nebo mědi, cukry nebo kyselina glukuronová u spektrofotometrických metod a citrát nebo peroxid vodíku u enzymatických metod. [71]

V literatuře je popsáno mnoho analytických metod k analýze AA v potravinách. Mezi nespektrofotometrické metody patří titrační metody, chemiluminiscence, průtoková injekční analýza (FIA), kapilární zónová elektroforéza (CZE) a plynová chromatografie (GC). Dalšími metodami analýzy vitamínu C jsou spektrofotometrické, fluorimetrické a elektrochemické metody. [72]

V současnosti je nejvíce preferovanou metodou pro analýzu celkového vitamínu C vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Tato metoda poskytuje vyšší selektivitu oproti spektrofotometrickým, titračním nebo enzymatickým metodám a obvykle není nutná

derivatizace. HPLC je obecně citlivější v závislosti na použitém detekčním systému. Nejběžnější detekční technikou je UV detekce. AA absorbuje UV záření při vlnové délce 254 nm (245–265 nm v závislosti na pH). DHAA absorbuje UV záření při vlnové délce 185 nm, ale nad 220 nm je absorpce slabá. Dalšími používanými detekčními technikami jsou elektrochemická detekce (ED), fluorescenční detekce (FD) nebo hmotnostní spektrometrie (MS) – nejcitlivější a nejvíce selektivní. Jen málo metod analýzy AA a DHAA využívá vnitřních standardů, proto lze stanovovat analyty v komplexních maticích (včetně potravin i biologických tekutin). [71]

AA je malá polární molekula rozpustná ve vodě a omezeně rozpustná v acetonitrilu, kyselině octové a v alkoholech s krátkým řetězcem (methanol, ethanol). Dále je zcela nerozpustná je v etheru, chloroformu, benzenu, petroletheru, v olejích a tucích.

Vitamin C patří k nejméně stabilním vitaminům. Při jeho analýze se dává důraz na extrakční podmínky a skladování roztoků. Největší ztráty vitaminu C v ovoci a zelenině způsobují endogenní oxidační enzymy – askorbát oxidasa a askorbát peroxidasa. [73] Dalšími faktory jsou světlo, teplota, nasycení kyslíkem a přítomnost kovů. V potravinách rostlinného původu je zpravidla 90–95 % vitaminu C přítomno ve formě AA, zbytek DHAA. [71]

Extrakce vitaminu C by měla probíhat v roztocích o nízkém pH, aby nedošlo k degradaci nebo ztrátám. Často se používá extrakce kyselinou. [74] Obecně platí, že pH kolem 2,1 je vhodné pro zajištění dobré stability a výtěžnosti AA. Mezi nejpoužívanější extrakční činidla patří kyselina methafosforečná, trichloroctová nebo šťavelová, ale lze použít i směsi (methanol, ethanol, EDTA, diethylentriaminpentaoctovou kyselinu, orthofosforečnou kyselinu, dithiotreitol, homocystein, glutathion,...) [71]

2.3.5.1 Titrační metody

Populárním titračním činidlem je 2,6-dichlorfenolindofenol (DCIP). Toto barvivo bývá také nazýváno jako Tillimansovo činidlo. Principem stanovení je oxidace kyseliny askorbové pomocí DCIP v kyselém prostředí (methafosforečná a octová kyselina). DCIP funguje i jako barevný indikátor, který přechází z modrého zbarvení do bezbarvého. Tato metoda není vhodná pro farmaceutické preparáty obsahující Fe^{2+} , Sn^{2+} , Cu^{+} , SO_3^{2-} a $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ionty. Přirozeně se vyskytující látky v ovoci a biologických materiálech (třísloviny, sulfohydrikové sloučeniny) jsou oxidovány barvivem, a tudíž negativně ovlivňují stanovení. Metoda je použitelná pouze pokud je koncentrace DHAA zanedbatelná, vzorek neobsahuje přírodní nebo umělé barvivo znemožňující určit bod ekvivalence a pokud vzorek neobsahuje další redukční činidla. Tento způsob stanovení AA se doporučuje pro citrusové ovoce a multivitaminové tablety bez obsahu minerálů. [72]

Jiná titrační metoda používá jako titrační činidlo tetrachlorbenzochinon. Princip je podobný jako u předchozí metody, jen se navíc používá EDTA jako chelatační činidlo a indikátor. Bod ekvivalence je dosažen při vzniku žlutého zbarvení roztoku. Případné rušení thiolů se dá zamaskovat přísadkou akrylamidu. [72]

Existují další titrační činidla, která se dají použít ke stanovení AA. Patří sem činidla zahrnující jod nebo brom (např. N-bromsukcinimid, bromičnan draselný, roztok jodu, jodičnan draselný), síran ceričitý nebo hexakynoželozitan draselný. [72]

2.3.5.2 Elektrochemické metody

Polarografické analýza zahrnuje elektrochemickou oxidaci AA a redukci kondenzačních produktů DHAA s o-fenylendiaminem na rtuťové kapkové elektrodě. Toto stanovení se používalo ke stanovení AA v kořeni, ovoci a zelenině, kojenecké výživě a léčivech. [72]

Voltametrické stanovení vitamínu C s použitím různých elektrod není příliš vhodné. Dochází zde k znečištění elektrod oxidačními produkty při opakovaném použití a tím ke snížení spolehlivosti metody. Výhodou této metody bylo stanovení vitamínu C i v silně zbarvených, viskózních a zakalených šťávách. [72]

Potenciometrické titrace využívají jako titrační činidla DCIP, N-bromsukcinimid, síran měďnatý, jod, hexykyanoželezitan draselný nebo tetrachlorbenzochinon. Podobně jako u voltametrického stanovení je nevýhodou znečištění elektrod (bílkovinami, organickými látkami). Výhodou je možnost stanovení i v silně barevných vzorcích. [72]

Coulometrie má omezené možnosti stanovení vitamínu C. Metoda je založena na kvantitativní oxidaci AA na platinové elektrodě, ale pouze v čistých roztocích. [72]

2.3.5.3 Fluorimetrické metody

Fluorimetrická analýza AA se používá pro ovoce, zeleninu a lidských sér. Pro metodu je zásadní vznik fluorescenčního produktu, např. produkt reakce DHAA (AA musí být nejdříve oxidována) s o-fenylendiaminem nebo kondenzace AA s 2-kyanoacetamidem. Nepřímé fluorimetrické metody jsou založeny na redukci Ce^{4+} za vzniku Ce^{3+} , které emitují charakteristické fluorescenční záření. [72]

2.3.5.4 Spektrofotometrická metoda

Celkový vitamin C se dá stanovit pomocí spektrofotometrických metod v ovoci a zelenině. Tyto metody zahrnují oxidaci AA na DHAA (např. bromovou vodou v přítomnosti octové kyseliny nebo DCIP). Následná reakce s 2,4-dinitrofenylhydrazinem v kyselém prostředí vytvoří červený komplex. Tato intenzita zbarvení odpovídá obsahu celkového vitamínu C v roztoku a jeho absorbance se měří při vlnové délce 521 nm. [75]

2.3.5.5 HPLC metody

Jak už bylo zmíněno, AA a DHAA jsou malé polární molekuly. Proto jsou obtížně udržitelné v klasické reverzní fázi (RP) od mrtvého objemu. Nejpoužívanějšími systémy pro stanovení vitamínu C jsou HPLC-RP, iontopárová, iotovýměnná chromatografie a chromatografie s iontovou výlukou. V poslední době se stala populární i kapalinová chromatografie s hydrofilní interakcí (HILIC). Mobilní fáze pro stanovení vitamínu C jsou často složité, s více než dvěma složkami, které mohou obsahovat modifikátory nebo další činidla. [71]

2.3.5.5.1 Chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC)

Pro stanovení AA a DHAA jsou široce používány stacionární fáze s oktadecylově (C18) modifikovaným silikagelem (ODS). Tento systém však trpí špatným rozlišením AA a mrtvého retenčního objemu. Pro dostatečnou retenci je nutné použít v mobilní fázi vysoké procento vody (někdy i 100 %) obvykle v anorganické/organické kyselině nebo v anorganickém pufru. Díky kyselinám nebo pufrům je udržováno nízké pH, které je podmínkou pro udržení neutrálních forem kyselin v systému.

Pro analýzu AA a DHAA se používají mobilní fáze s obsahem kyseliny trifluoroctové, kyseliny sírové nebo fosforečné s pH okolo 2,0.

Nevýhodou mobilní fáze se 100% zastoupením vody je nepřítomnost organického modifikátoru, který pozitivně ovlivňuje účinnost separace na ODS stacionární fázi. Další nevýhodou je velmi nízké pH, které přispívá k urychlení degradace kolony na bázi silikagelu, protože se rozpouští oxid křemičitý. [71]

2.3.5.5.2 Iontopárová chromatografie

V tomto systému je nutné použít iontopárová činidla spolu s anorganickými pufrů. Použití anorganických pufrů může způsobit problémy v systému. Anorganické soli mohou ucpat některé prvky v chromatografickém systému, což povede k poruše přístroje. Při přechodu z vodného pufru do elučního činidla (s příměsí organického činidla) se musí postupovat pomalu, aby nedošlo k vysrážení pufru. Dále anorganické pufrů nejsou kompatibilní s hmotnostní detekcí, protože nejsou těkavé. Iontopárová činidla mají sklon působit nestabilitu v dělení, nebo postupně zvyšují tlak s každým nástřikem. Z těchto důvodů nejsou iontopárové chromatografické postupy ideální pro moderní analytické laboratoře.

Mobilní fáze u tohoto systému je velmi složitá, s pěti nebo i více složkami. Reprodukovatelnost a selektivita systému může být slabší. Retence závisí na typu a koncentraci iontopárového činidla a analytické kolony. [71]

2.3.5.5.3 Iontovměnná chromatografie

Systém využívá toho, že AA je slabá organická kyselina a může být zachycena silným aniontovým měničem. Používali se i metody se stacionární fází modifikovanou amino skupinou. Jako mobilní fáze se používá anorganická kyselina nebo pufr při nízkém pH. Tento postup se nestal populární pro stanovení AA a DHAA. [71]

2.3.5.5.4 Chromatografie s iontovou výlukou (ion-exclusion)

Stacionární fáze systému je tvořena sulfonovanými sférickými PS/DVB (polystyren/divinylbenzen) pryskyřicemi v různé iontové formě. Retence na kolonách je řízena elektrostatickými odpuzivými silami, hydrofobními interakcemi a efektem iontové výluky. Sulfoskupina na stacionární fázi odpuzuje ionty se stejným nábojem elektrostatickými silami, aby jim zamezila pronikat do porézního systému. Mobilní fázi tvoří anorganická kyselina (nejčastěji sírová, fosforečná, sulfonová) bez organického modifikátoru.

Silně ionizované rozpuštěné látky jsou vyloučeny ze systému pórů. Neutrální rozpuštěné látky nejsou ovlivňovány elektrostatickými silami, vstupují do pórů a rozštěpují se díky hydrofobním interakcím. AA a DHA jsou eluovány někde mezi. Retence je také ovlivněna velikostí molekul.

Výhodou této metody je odolnost stacionární fáze vůči velmi kyselým mobilním fázím. Tato metoda byla nejvyužívanější v 90. letech. [71]

2.3.5.5.5 HILIC

HILIC (kapalinová chromatografie s hydrofilními interakcemi) je alternativou k RP-HPLC a je výhodná pro analýzu malých polárních molekul, které se slabě vážou nebo jsou vymývány s mrtvým objemem RP-HPLC systémů. Analyt je zde dělen mezi vodou obohacenou vrstvou nehybného eluentu na hydrofilní stacionární fázi a relativně hydrofobní část elučního činidla. Eluční činidlo je složeno z 5–40 % vody v acetonitrilu. Mobilní fáze tedy obsahuje vysoký podíl organického rozpouštědla, což je výhodné při spojení s MS detekcí. Eluce je zajištěna zvyšováním polarit mobilní fáze (přidáváním vodné fáze).

Aplikace HILIC zahrnuje většinu polárních sloučenin, nabitých i bez náboje. AA byla touto metodou (bez DHAA) analyzována v potravinách, nápojích a ve farmaceutických přípravcích. [71]

2.3.5.5.6 Obecně o HPLC

Chromatografické metody patří mezi separační techniky. Princip je založen na dělení (separaci) jednotlivých složek ve vzorku mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze – mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou). Jednotlivé složky vzorku v kapalinové chromatografii interagují s mobilní i stacionární fází. V kapalinové chromatografii je používána kapalina jako mobilní fáze. Metoda je vhodná pro separaci tepelně nestálých a netěkavých sloučenin, protože pracuje většinou při laboratorní teplotě. Nejvíce se pracuje s elučním vyvíjením chromatogramu, kdy se nadávkuje vzorek a kontinuálně se přivádí eluční činidlo. V dnešní době je nejvíce používána vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC = High performance liquid chromatography).

Instrumentace HPLC

Základem chromatografu je čerpadlo, injektor, kolona, detektor a vyhodnocovací zařízení.

Mobilní fáze (MF) je uchovávána ve skleněných lahvích (1–4 s různými objemy) a než je čerpadlem dávkována na kolonu, je nutné ji odplynit. Odplynění se provádí vakuovým odplyňovačem přímo v přístroji nebo u starších přístrojů ručně pomocí ultrazvuku. Moderní přístroje směřují jednotlivé mobilní fáze v směšovací komoře dle zvoleného poměru. Takto připravená MF je čerpána pomocí čerpadla na kolonu. Eluce může být dvojího typu, a to izokratická (MF je stejná po celou dobu analýzy) nebo gradientová (v průběhu analýzy se mění poměr složek MF, a tím se zvyšuje eluční síla). Na HPLC čerpadla jsou kladeny dva základní požadavky, a to schopnost udržet vysoký tlak (až 42 MPa) a nízký průtok (v rozmezí 0,1–10 ml/min) s co nejnižšími rázy. [76]

Dávkování vzorku může probíhat několika způsoby. Nejjednodušší možností je dávkování pomocí injekční stříkačky (o malém objemu) do dávkovací smyčky. Dávkovací smyčka nadávkuje přesný objem na kolonu a přebytek vypustí do odpadu. V modernějších přístrojích převládá automatický dávkovač neboli autosampler. Přístroji se zadají příslušné údaje (objem, umístění, počet nástřiků) a on si sám nadávkuje potřebný objem.

V HPLC se často používají částicové náplňové kolony, méně pak monolitické. Náplň částicových kolon je tvořena značným množstvím malých částic o velkém povrchu. Délka kolon se pohybuje v rozmezí 15–25 cm s vnitřním průměrem 2–5 mm. Materiálem HPLC kolon může být nemodifikovaný nebo modifikovaný (oktyl-, oktadecyl-, amino-,...) silikagel, oxidy kovů (oxid hlinitý, titaničitý nebo zirkoničitý), hybridní částice (organosiloxany), organické polymery (styren-divinylbenzen) nebo monolity (kontinuální separační média). Částicové kolony s nemodifikovaným silikagelem jsou polární a nejvíce zadržují polární látky. Modifikovaný silikagel se používá k dělení nepolárních a slabě polárních látek. Monolitické kolony jsou plněny porézním síťovaným materiálem syntetizovaným in-situ (přímo v koloně). Nejčastěji se jedná o silikagel a organické polymery. [76]

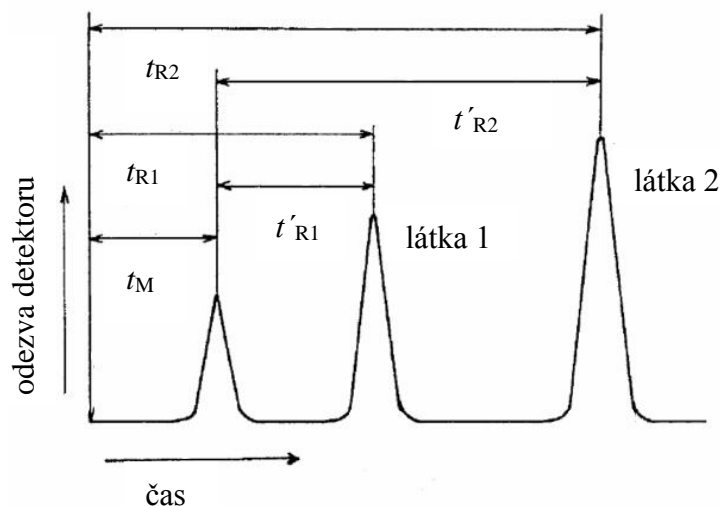
Podle vlastností a struktury separovaných látek, typu a složení mobilní fáze se v HPLC používají různé detektory. S HPLC jsou kompatibilní UV/VIS, refraktometrický, fluorimetrický a elektrochemický detektor, detektor rozptylu světla nebo MS detektor. V novějších přístrojích se nejčastěji využívá detektor s diodovým polem (DAD). DAD je možné

použit pro detekci látek, které jsou schopné absorbovat záření v UV/VIS oblasti. Množství analytu je poté úměrné množství absorbovaného záření. DAD umožňují snímat celé spektrum vlnových délek v reálném čase. Jako zdroj UV záření bývá používána deuteriová lampa a pro viditelné záření wolframová lampa.

Záznam a vyhodnocení dat obstarává počítač, který je připojen k chromatografu. Firma dodávající přístroj většinou dodá i příslušný software, který je schopný automaticky vyhodnotit retenční charakteristiky a z plochy píků vypočítá koncentrace příslušných složek vzorku.

Retenční charakteristiky a účinnost kolon

Výsledkem procesu je chromatogram (Obr. 14), což je závislost odezvy detektoru na čase (méně často na objemu). Retenční čas t_R (doba od nástřiku po maximální eluci analytu) je charakteristická veličina pro jednotlivé separované složky vzorku a je hlavním kritériem pro kvalitativní analýzu. Další retenčními charakteristikami jsou mrtvý retenční čas t_M (doba strávená inertní látkou na koloně) a redukovaný retenční čas t'_R (rozdíl retenčního času a mrtvého retenčního času). Pro kvantitativní analýzu je hlavním kritériem plocha a výška píku. [77]



Obrázek 15: Obecný chromatogram

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

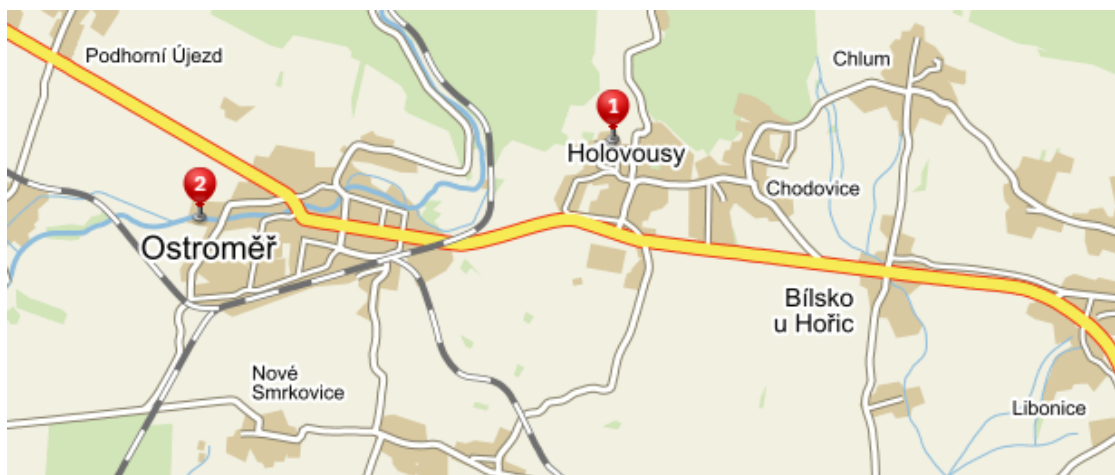
3.1 Použité vzorky

K analýze bylo použito 12 odrůd černého rybízu (Tab. 14) pocházejících ze dvou stanovišť. Na prvním stanovišti – Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s. r. o. (VSUO) byly odrůdy pěstovány ve dvou tvarových modifikacích, a to KEŘ a V (keř střižený do tvaru V) a takto byly i dodány. Druhé stanoviště patří soukromému pěstiteli (SP). Zde byly odrůdy také pěstovány ve dvou tvarových modifikacích, ale při sběru nebyly tyto tvarové modifikace odlišeny. Všechny vzorky byly sesbírány v létě 2014 a následně byly uchovávány v mrazničce při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do analýzy.

Tabulka 14: Analyzované odrůdy černého rybízu

1.	Ben Conan	7.	Fokus
2.	Ben Gairn	8.	Lota
3.	Ben Hope	9.	Morávia
4.	Ben Lomond	10.	Ometa
5.	Ceres	11.	Ruben
6.	Démon	12.	Triton

Tyto dvě stanoviště jsou od sebe vzdáleny jen pár kilometrů (Obr. 16). Lze tedy předpokládat, že půdní i meteorologické podmínky nejsou výrazně odlišné. Jaro a léto 2014 bylo méně bohaté na srážky, a proto bylo nutné zavlažovat.



Obrázek 16: Mapa se stanovišti: 1 – VSUO, 2 – SP

3.2 Stanovení celkových fenolických látek pomocí Folin–Ciocalteuova činidla

3.2.1 Použité pomůcky, přístroje a chemikálie

Pomůcky

- běžné laboratorní sklo
- Büchnerova nálevka
- odsávací baňka
- stojan na zkumavky
- filtrační papír KA0 (papírny Pernštejn, Česká republika)
- mikropipeta 200 μl , 1000 μl (Biohit, Finsko)
- centrifugační skleněné kyvety

- skleněná kyveta

Přístroje

- lednička s mrazničkou (Amica AD 250, Česká republika)
- analytické váhy (Boeco, Německo)
- homogenizátor Ultra Turrax T18 (IKA, Německo)
- centrifuga (MLW, Německo)
- membránová vývěva (Labicom, Česká republika)
- vortex (TTS 2 Yellow line, USA)
- UV/VIS spektrofotometr Helios γ (Spectronic Unicam, USA)

Chemikálie

- Folin–Ciocalteuovo činidlo (Penta, Česká republika)
- bezvodý uhličitán sodný (Lachema a. s., Česká republika)
- kyselina gallová (Penta, Česká republika)

3.2.2 Příprava roztoků a kalibrační řady

- 7,5% roztok uhličitanu sodného

7,5 g uhličitanu sodného bylo rozpuštěno v destilované vodě a kvantitativně převedeno do 100ml odměrné baňky. Roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

- Standardní roztok kyseliny gallové

Roztok kyseliny gallové o koncentraci $1\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 0,025 g kyseliny gallové v destilované vodě a kvantitativním převedením do 25ml odměrné baňky. Roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

- Kalibrační křivka

Byla připravena řada šesti kalibračních standardů o koncentraci 10, 20, 50, 100, 250 a $500\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Do šesti 10ml odměrných baněk bylo postupně napipetováno 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,5 a 5,0 ml standardního roztoku kyseliny gallové a doplněno destilovanou vodou po rysku. Pro měření bylo do zkumavek napipetováno po 1,0 ml zředěného Folin–Ciocalteuova činidla (destilovanou vodou v poměru 1 : 9), 1,0 ml destilované vody a 50 μl připraveného kalibračního standardu. Připravený roztok byl promíchán na vortexu a ponechán stát 5 min. Poté bylo přidáno do roztoku 1,0 ml 7,5% roztoku uhličitanu sodného a obsah byl opět promíchán na vortexu. Po 2 hodinách stání byla u takto připravených roztoků změřena absorbance při vlnové délce 750 nm. Blank byl připraven stejným způsobem jako kalibrační řada, pouze objem přidávaného kalibračního standardu byl nahrazen stejným objemem destilované vody.

3.2.3 Příprava vzorků a vlastní analýza

Na analytických vahách bylo naváženo kolem 5 g vzorku černého rybízu s přesností na 4 desetinná místa. Ke vzorku bylo přidáno asi 20 ml destilované vody a směs byla zhomogenizována homogenizátorem. Směs byla kvantitativně převedena do 50ml odměrné kádinky a doplněna destilovanou vodou po rysku. Takto připravená směs byla ponechána 24 hodin v ledničce. Vzniklá suspenze byla poté odstředěna na laboratorní centrifuze při

2000 otáčkách za minutu po dobu 2,5 minuty. Odstředěná suspenze byla přefiltrována na Büchnerově nálevce s řídkým filtrem pomocí membránové vývěvy.

Do tří zkumavek byl napipetován 1,0 ml zředěného Folin–Cioacaltauova činidla (destilovanou vodou v poměru 1 : 9), 1,0 ml destilované vody a 50 µl ředěného vzorku. Každý připravený vzorek černého rybízu byl zředěn dvakrát (vzorek : destilovaná voda = 1 : 1). Takto připravené roztoky byly promíchány na vortexu a ponechány stát 5 min. Poté bylo přidáno do roztoků 1,0 ml 7,5% roztoku uhličitanu sodného a obsah byl opět promíchán na vortexu. Po 2 hodinách stání byla změřena absorbance při vlnové délce 750 nm. Blank byl připraven stejným způsobem jako vzorek, pouze objem přidaného vzorku byl nahrazen stejným objemem destilované vody.

Tímto způsobem byla každá odrůda analyzována třikrát.

3.2.4 Výpočet

Pomocí rovnice regrese kalibrační křivky kyseliny gallové byl vypočítán obsah celkových fenolických látek ve vzorcích:

$$A = 0,0018c - 0,0213 \quad (1).$$

Výsledná koncentrace fenolických látek byla přepočítána na mg GAE (ekvivalent kyseliny gallové) na 100 g čerstvých plodů.

3.3 Stanovení celkových anthokyanů pomocí pH diferenciální metody

3.3.1 Použité pomůcky, přístroje a chemikálie

Pomůcky

- běžné laboratorní sklo
- Büchnerova nálevka
- odsávací baňka
- stojan na zkumavky
- filtrační papír KA0 (papírny Pernštejn, Česká republika)
- mikropipeta 200 µl, 1000 µl (Biohit, Finsko)
- automatická pipeta 5,0 ml
- centrifugační skleněné kyvety
- skleněná kyveta

Přístroje

- lednička s mrazničkou (Amica AD 250, Česká republika)
- analytické váhy (Boeco, Německo)
- homogenizátor Ultra Turrax T18 (IKA, Německo)
- centrifuga (MLW, Německo)
- membránová vývěva (Labicom, Česká republika)
- vortex (TTS 2 Yellow line, USA)
- pH metr MPH 372 (Monokrystaly, Česká republika)
- magnetická míchačka (IKA, Německo)
- UV/VIS spektrofotometr Helios γ (Spectronic Unicam, USA)

Chemikálie

- chlorid draselný p. a. (Lachema, Česká republika)

- koncentrovaná kyselina chlorovodíková (Lach-ner, Česká republika)
- sodná sůl kyseliny octové p. a. (Lachema, Česká republika)

3.3.2 Příprava roztoků

- pufr chloridu draselného o pH 1,0 a koncentraci $0,025 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

Na analytických vahách bylo naváženo přibližně 0,93 g chloridu draselného. Navážka byla kvantitativně převedena do 500ml kádinky pomocí destilované vody. Do kádinky bylo celkově přidáno asi 490 ml destilované vody. Kádinka s roztokem byla umístěna na magnetickou míchačku a do roztoku byl ponořen pH metr. Do roztoku byla následně postupně přidávána koncentrovaná kyselina chlorovodíková dokud pH nebylo rovno 1,0. Takto upravený pufr byl kvantitativně převeden do 500ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku.

- pufr octanu sodného o pH 4,5 a koncentraci $0,4 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

Na analytických vahách bylo naváženo přibližně 27,215 g pevného octanu sodného. Navážka byla kvantitativně převedena do 500ml kádinky pomocí destilované vody. Do kádinky bylo celkově přidáno asi 480 ml destilované vody. Kádinka s roztokem byla umístěna na magnetickou míchačku a do roztoku byl ponořen pH metr. Do roztoku byla následně postupně přidávána koncentrovaná kyselina chlorovodíková do pH 4,5. Takto upravený pufr byl kvantitativně převeden do 500ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku.

3.3.3 Příprava vzorků a vlastní analýza

Na analytických vahách bylo naváženo kolem 5 g vzorku černého rybízu s přesností na 4 desetinná místa. Ke vzorku bylo přidáno asi 20 ml destilované vody a směs byla zhomogenizována homogenizátorem. Směs byla kvantitativně převedena do 50ml odměrné kádinky a doplněna destilovanou vodou po rysku. Takto připravená směs byla ponechána 24 hodin v ledniče. Vzniklá suspenze byla poté odstředěna na laboratorní centrifuze při 2000 otáčkách za minutu po dobu 2,5 minuty. Odstředěná suspenze byla přefiltrována na Büchnerově nálevce s řídkým filtrem pomocí membránové vývěvy.

Do třech zkumavek bylo napipetováno 2,9 ml pufru chloridu draselného ($0,025 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a 0,1 ml odstředěné šťávy z černého rybízu. Do dalších třech zkumavek bylo napipetováno 2,9 ml pufru octanu sodného ($0,4 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a 0,1 ml odstředěné šťávy z černého rybízu. Zkumavky byly důkladně promíchány pomocí vortexu. U takto připravených roztoků vzorků byla změřena absorbance při vlnových délkách 510 nm a 700 nm. Jako blank byla použita destilovaná voda.

Tímto způsobem byla každá odrůda analyzována třikrát.

3.3.4 Výpočet

Z naměřených hodnot absorbancí vzorků černého rybízu byla vypočtena koncentrace monomerního pigmentu, a to kyanidin 3-rutinosidu, který je nejvíce zastoupen v plodech rybízů. Výsledná koncentrace byla vypočtena podle následujících vzorců:

- absorbance ředěných vzorků

$$A = (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}=1} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}=4,5} \quad (2),$$

kde je: A – absorbance vzorku při dané vlnové délce a pH pufru.

- koncentrace monomerního pigmentu ve vzorku

$$c_{MP} = \frac{A \cdot M \cdot F \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l} \quad (3),$$

kde je: c_{MP} – výsledná koncentrace monomerního pigmentu ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$),
 A – absorbance zředěného vzorku (-),
 M – molekulová hmotnost pigmentu kyanidin 3-rutinosidu ($595,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$),
 F – faktor ředění (-),
 ε – molární absorpční koeficient pro kyanidin 3-rutinosid ($28\,800 \text{ l} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$),
 l – délka absorbující vrstvy = délka kyvety (cm).

Nakonec byla koncentrace monomerního pigmentu přepočtena na výslednou koncentraci anthokyanů ve vzorcích v mg na 100 g čerstvých plodů.

3.4 Stanovení vitamínu C metodou HPLC

3.4.1 Použité pomůcky, přístroje a chemikálie

Pomůcky

- běžné laboratorní sklo
- Büchnerova nálevka
- odsávací baňka
- filtrační papír KA0 (papírny Pernštejn, Česká republika)
- mikropipeta 200 μl , 1000 μl (Biohit, Finsko)
- automatická pipeta 5,0 ml (Biohit, Finsko)
- centrifugační skleněné kyvety
- injekční stříkačky 2,0 ml (Chirana Injekta, Slovenská republika)
- celulózové mikrofiltry 0,45 μm (Chromservis, Česká republika)
- vialky 1,5 ml (Agilent, USA)

Přístroje

- lednička s mrazničkou (Amica AD 250, Česká republika)
- analytické váhy (Boeco, Německo)
- homogenizátor Ultra Turrax T18 (IKA, Německo)
- centrifuga (MLW, Německo)
- membránová vývěva (Labicom, Česká republika)
- přístroj na přípravu demineralizované vody (Watrex, Česká republika)
- vodní lázeň (Kraintek, Slovenská republika)
- HPLC 1200 Infinity Series (Agilent, USA)

Chemikálie

- redestilovaná voda
- kyselina L-askorbová (Riedel-de Haen, Německo)
- kyselina monohydrogenfosforečná (Fluka, Německo)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema, Česká republika)
- methanol, HPLC-grade (Sharlau chemie a. s., Španělsko)

3.4.2 Příprava roztoků a kalibrační řady

- mobilní fáze – fosfátový pufr : methanol (9 : 1)

Na analytických vahách bylo naváženo kolem 13,6025 g dihydrogenfosforečnanu draselného. Navážka byla kvantitativně rozpuštěna v litrové zásobní láhvi pomocí 900 ml redestilované vody. Nakonec bylo přidáno 100 ml methanolu. Mobilní fáze byla připravena dle normy ČSN EN 14130 z roku 2004. [78]

- extrakční roztok 6% kyseliny monohydrogenfosforečné

Na předvážkách bylo naváženo 30 g kyseliny monohydrogenfosforečné. Navážka byla kvantitativně rozpuštěna v přibližně 300 ml horké redestilované vody. Po ochlazení byl roztok kvantitativně převeden do 500ml odměrné baňky a doplněn redestilovanou vodou po rysku. Připravený roztok byl uchováván v lednici při 4 °C.

- standardní roztok kyseliny askorbové o koncentraci 1 g·l⁻¹

Na analytických vahách bylo naváženo 0,0500 g kyseliny askorbové. Navážka byla kvantitativně převedena do 50ml odměrné baňky pomocí 6% kyseliny monohydrogenfosforečné a doplněna po rysku stejnou kyselinou.

- kalibrační křivka

Byla připravena řada čtyř kalibračních standardů o koncentraci 1, 10, 20 a 40 mg·l⁻¹. Do čtyř 10ml odměrných baněk bylo postupně napipetováno 0,025; 0,250; 0,500 a 1,000 ml standardního roztoku kyseliny askorbové a doplněno 6% kyselinou monohydrogenfosforečnou po rysku. Všechny standardy byly přes 0,45 µm celulókový filtr nasány do stříkačky a nastříknuty do vialek z tmavého skla. Vialky byly do analýzy skladovány v lednici.

3.4.3 Příprava vzorků a vlastní analýza

Na analytických vahách bylo naváženo kolem 2 g vzorku černého rybízu s přesností na 4 desetinná místa. Ke vzorku bylo přidáno asi 15 ml 6% kyseliny monohydrogenfosforečné a směs byla zhomogenizována homogenizátorem. Směs byla kvantitativně převedena do 25ml odměrné kádinky a doplněna 6% kyselinou monohydrogenfosforečnou po rysku. Vzniklá suspenze byla poté odstředěna na laboratorní centrifuze při 2000 otáčkách za minutu po dobu 2,5 minuty. Odstředěná suspenze byla přefiltrována na Büchnerově nálevce s řídkým filtrem pomocí membránové vývěvy. Každý vzorek šťávy byl následně desetkrát zředěn. Zředěný vzorek byl přes 0,45 µm celulókový filtr nasán do stříkačky a nastříknut do vialky z tmavého skla. Vialky byly do analýzy skladovány v lednici.

Před nástřikem byly vialky umístěny do autosampleru a v programu Agilent (online) byly nastaveny parametry pro analýzu (umístění vialky, název vzorku, zvolená metoda, počet nástřiků a objem nástřiku). Každá analýza byla hotova za 5 minut.

Tímto způsobem byla každá odrůda analyzována třikrát.

Vlastní analýza vitaminu C proběhla na koloně Gemini C18 o rozměru 150 × 4,6 mm s průměrem částic 5 µm. Jako mobilní fáze byl použit fosfátový pufr s methanolem (9 : 1). Extrakčním činidlem vitaminu C byla kyselina monohydrogenfosforečná. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml·min⁻¹ a velikost nástřiku byla 10 µl. Během analýzy byl termostat nastaven na 30 °C. Analyt byl detekován při vlnové délce 254 nm.

Stanovení vitamínu C bylo provedeno na HPLC 1200 Infinity Series firmy Agilent s kvartérní pumpou, vakuovým odplyňovačem, klimatizovaným autosamplerem a s detektorem – diodové pole s 6cm průtočnou celou (prvních 14 dní bylo pracováno na DAD s 3cm průtočnou celou, výsledky označené hvězdičkou (*) byly analyzovány tímto způsobem).

3.4.4 Výpočet

Kyselina askorbová byla eluována přibližně v 1,9 minutě. Plochy píků kalibrační řady i vzorků byly integrovány programem Agilent (offline). Tyto hodnoty byly transportovány s kompletním reportem do programu Excel. Z příslušných hodnot kalibračních roztoků byla vytvořena kalibrační křivka s její regresní rovnicí. Koncentrace vitamínu C byla vypočítána pomocí regresní rovnice kalibrační křivky ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$):

$$*A = 21,324c + 17,147 \quad (4),$$

$$A = 172,099c - 194,775 \quad (5).$$

* měřeno detektorem s jinou průtočnou celou, viz 3.4.3

Výsledná koncentrace vitamínu C, jako kyseliny askorbové, byla přepočítána z $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ na $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ čerstvých plodů.

3.5 Statistické zpracování výsledků

Pro všechny stanovení byly vzorky vždy třikrát paralelně analyzovány. Každé paralelní stanovení bylo třikrát opakováno a z těchto hodnot byl vždy vytvořen průměr. Následné statistické zpracování se uplatňovalo na těchto průměrech paralelních stanovení.

Vylučování odlehlých výsledků

K tomuto zpracování se nejčastěji používá Dean–Dixonův test, díky kterému se projeví přítomnost hrubé chyby v paralelním stanovení.

Nejdříve je nutné seřadit si hodnoty výsledků od nejnižší po nejvyšší – x_1 (nejnižší hodnota), x_2, \dots, x_{n-1}, x_n (nejvyšší hodnota). Poté se vypočítá variační rozpětí R , což je rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou ($x_n - x_1$). Následně je možné přikročit k výpočtu samotného Dean–Dixonova testu odlehlosti dle vzorců Q_1 a Q_n :

$$Q_1 = \frac{x_2 - x_1}{R}; Q_n = \frac{x_n - x_{n-1}}{R} \quad (6); (7).$$

Hodnoty Q_1 a Q_n se nakonec porovnají s kritickou hodnotou Dean–Dixonova testu $Q_{n,\alpha}$, kde n je počet hodnot výsledků a α je hladina statistické významnosti (udává pravděpodobnost, s jakou se daný parametr neocitne v intervalu spolehlivosti při opakovaném výběru – nejčastěji 0,05). Pokud je Q_1 vyšší než $Q_{n,\alpha}$, tak je rozdíl $x_2 - x_1$ statisticky významný na hladině statistické významnosti α a znamená to, že výsledek není správný. Tento odlehlý výsledek se musí vyloučit a už se s ním nepočítá. Pokud je Q_1 menší než $Q_{n,\alpha}$, tak je rozdíl $x_2 - x_1$ statisticky nevýznamný na hladině statistické významnosti α a znamená to, že výsledek je správný. Stejný postup platí pro Q_n .

Pro tři hodnoty a hladinu statistické významnosti 0,05 je $Q_{n,\alpha} = 0,941$.

Interval spolehlivosti

Interval spolehlivosti je míra nepřesnosti měření. Délka závisí na hladině spolehlivosti, což je pravděpodobnost s jakou se odhadovaný parametr ocitne v intervalu spolehlivosti při opakovaném výběru (nejčastěji 95 % nebo 99 %).

Výpočet:

$$IS = \bar{x} \pm t_{\alpha,n} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (8),$$

kde je: IS – interval spolehlivosti,

\bar{x} – průměr hodnot souboru,

$t_{\alpha,n}$ – kritická hodnota pro zvolenou hladinu statistické významnosti α a počet hodnot n ,

$$s - \text{směrodatná odchylka } s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}},$$

n – počet hodnot v souboru.

Interval spolehlivosti umí program Excel vypočítat pomocí funkce CONFIDENCE pro zvolený počet hodnot a hladinu statistické významnosti. Před tím je nutné vypočítat směrodatnou odchylku pomocí funkce SMODCH.VÝBĚR.

Ověřování shodnosti výsledků

Shodnost výsledků je definována jako statistická nevýznamnost rozdílu aritmetických průměrů získaných dvěma způsoby. Posouzení tohoto faktu se děje na základě statistických testů, tedy srovnáním vypočtené hodnoty testového kritéria s tabelovanou kritickou hodnotou na hladině statistické významnosti.

Pro stejný počet paralelních stanovení v obou testovaných souborech ($n_A = n_B = n$) se nejčastěji používá Studentův t-test:

$$t = \frac{|\bar{x}_A - \bar{x}_B| \cdot \sqrt{n-1}}{\sqrt{s_A^2 + s_B^2}} \quad (9),$$

kde je: t – vypočtené testové kritérium,

\bar{x} – průměrná hodnota příslušného souboru dat,

n – počet stanovení v jednom ze souboru (platí $n_A = n_B$),

s – směrodatná odchylka příslušného souboru (případně s^2 – rozptyl).

Hodnota t se porovná s kritickou hodnotou Studentova t-testu $t_{n,\alpha}$, kde n je počet hodnot výsledků a α je hladina statistické významnosti (nejčastěji 0,05). Pokud je t vyšší než $t_{n,\alpha}$, tak je rozdíl $x_A - x_B$ statisticky významný na hladině statistické významnosti α a znamená to, že výsledky nejsou shodné. Pokud je t menší než $t_{n,\alpha}$, tak je rozdíl $x_A - x_B$ statisticky nevýznamný na hladině statistické významnosti α a znamená to, že výsledky jsou shodné.

Tabelovaná hodnota pro $t_{3,0,05}$ je 4,303.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Celkem bylo analyzováno 12 různých odrůd černého rybízu ze dvou stanovišť. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o. (VSUO) dodal každou odrůdu ve dvou tvarových modifikacích (KEŘ a V). Soukromý pěstitel (SP) smíchal modifikace dohromady.

4.1 Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Fenolické látky v šťávách černých rybízů byly stanovovány spektrofotometricky postupem uvedeným v kapitole 3.2. Kalibrační křivka kyseliny gallové byla připravena podle téže kapitoly. Za pomoci regresní rovnice kalibrační křivky byl vypočítán obsah celkových fenolických látek v jednotlivých vzorcích šťáv. Výsledné koncentrace jsou uváděny v mg GAE·100 g⁻¹ čerstvých plodů (ekvivalent kyseliny gallové). Získané výsledky byly statisticky zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2013 (kapitola 3.5).

V literatuře je uvedeno, že obsah fenolických látek v plodech černých rybízů by se měl pohybovat v rozmezí 227–789 mg·100 g⁻¹ čerstvých plodů. (14)

Graf kalibrační křivky kyseliny gallové je uveden v příloze č. 1. Kalibrační závislost je ve studovaném rozsahu lineární. Regresní koeficient R^2 je 0,999, což značí velmi dobrou linearitu.

4.1.1 Stanovení fenolických látek ve vzorcích z VSUO

V Tab. 14 a 15 jsou uvedeny průměrné naměřené hodnoty absorbancí vzorků a vypočtené hodnoty celkového obsahu fenolických látek (FL) s hodnotou intervalu spolehlivosti na hladině statistické významnosti 0,05.

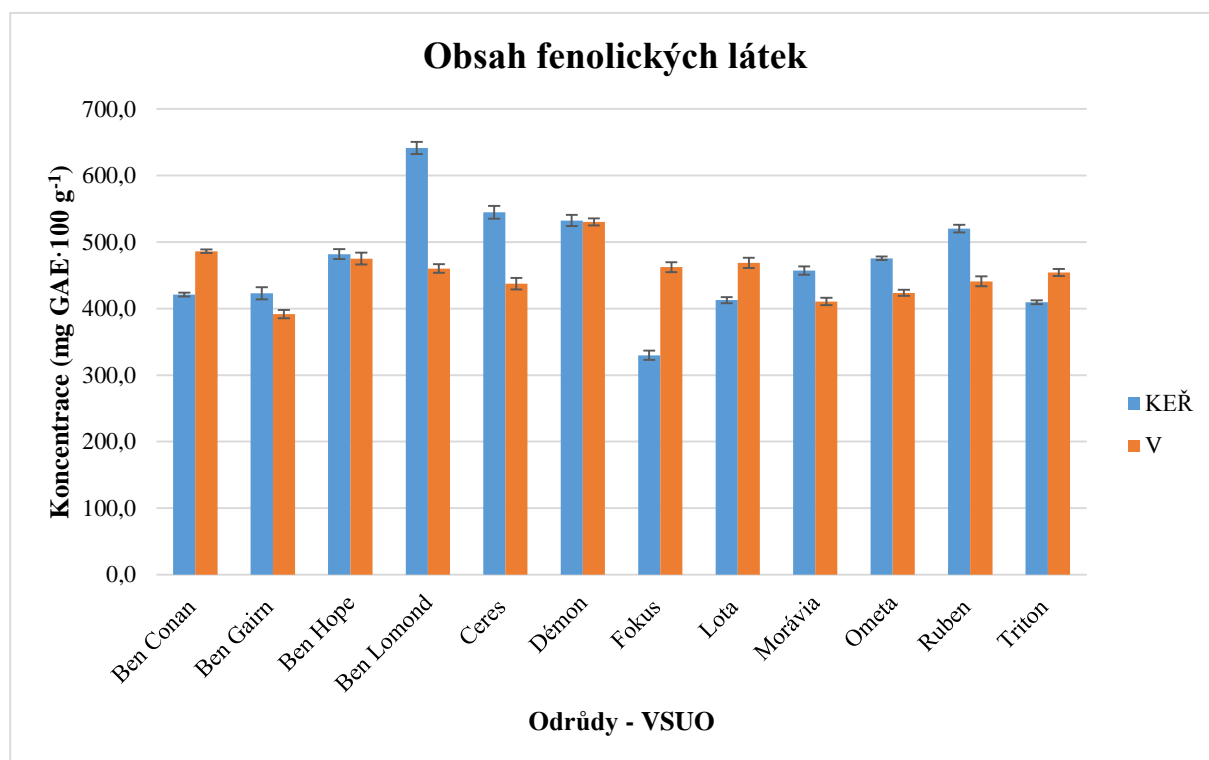
Tabulka 14: Naměřené hodnoty absorbancí a vypočtené hodnoty celkového obsahu FL ve šťávách černých rybízů tvarové modifikace KEŘ z VSUO

Odrůda	Průměrné hodnoty absorbance (nm)	Celkový obsah FL (mg GAE·100 g ⁻¹)
Ben Conan	0,314	421,1 ± 3,0
Ben Gairn	0,317	422,9 ± 9,1
Ben Hope	0,377	481,9 ± 7,5
Ben Lomond	0,483	641,4 ± 9,3
Ceres	0,408	544,8 ± 9,8
Démon	0,369	532,5 ± 8,5
Fokus	0,219	329,7 ± 7,0
Lota	0,336	412,8 ± 4,6
Morávia	0,308	457,1 ± 6,3
Ometa	0,356	475,7 ± 2,9
Ruben	0,432	520,2 ± 6,0
Triton	0,291	409,6 ± 3,1

Tabulka 15: Naměřené hodnoty absorbancí a vypočtené hodnoty celkového obsahu FL ve šťávách černých rybízů tvarové modifikace V z VSUO

Odrůda	Průměrné hodnoty absorbance (nm)	Celkový obsah FL (mg GAE·100 g ⁻¹)
Ben Conan	0,387	486,3 ± 2,8
Ben Gairn	0,271	391,9 ± 6,1
Ben Hope	0,354	475,2 ± 8,9
Ben Lomond	0,401	460,3 ± 6,3
Ceres	0,324	437,4 ± 8,6
Démon	0,428	530,3 ± 5,4
Fokus	0,310	462,3 ± 7,2
Lota	0,355	468,7 ± 7,8
Morávia	0,318	410,6 ± 5,5
Ometa	0,307	423,6 ± 4,5
Ruben	0,351	441,0 ± 7,4
Triton	0,327	454,3 ± 5,3

Pro přehledné porovnání jsou v Grafu 1 uvedeny hodnoty obsahu FL a jejich intervaly spolehlivosti (jako chybové úsečky).



Graf 1: Porovnání obsahu fenolických látek odrůd černých rybízů (KEŘ i V) z VSUO

Nejvyšší obsah fenolických látek v tvarové modifikaci KEŘ byl stanoven v odrůdě Ben Lomond 641,4 mg na 100 g plodů, naopak nejnižší obsah v odrůdě Fokus 329,7 mg na 100 g plodů. Obsah fenolických látek u zbylých odrůd se pohyboval v rozmezí 409,6–544,8 mg na

100 g plodů. Vyšší hodnoty obsahu FL u modifikace KEŘ byly stanoveny u odrůd Ceres (544,8 mg·100 g⁻¹), Démon (532,5 mg·100 g⁻¹) a Ruben (520,2 mg·100 g⁻¹).

Nejvyšší obsah FL v tvarové modifikaci V byl stanoven v odrůdě Démon 530,3 mg na 100 g plodů a naopak nejnižší obsah v odrůdě Ben Gairn 391,9 mg na 100 g plodů. Obsah FL u zbylých odrůd se pohyboval v rozmezí 410,0–486,3 mg na 100 g plodů. Vyšší hodnoty obsahu FL u modifikace V byly stanoveny v odrůdách Ben Conan (486,3 mg·100 g⁻¹), Ben Hope (475,2 mg·100 g⁻¹) a Lota (468,7 mg·100 g⁻¹).

Všechny stanovené hodnoty obsahu FL odpovídaly rozmezí hodnot uvedené v literatuře i přesto, že v našem postupu není zahrnuta extrakce FL ze slupek na rozdíl od literatury.

V Tab. 16 jsou uvedeny vypočtené hodnoty Studentova t-testu (t) pro porovnání shodnosti výsledků obsahu FL mezi tvarovými modifikacemi KEŘ a V z VSUO. Dále je v tabulce vyjádření, zda jsou výsledky shodné či nikoliv v porovnání s tabelovanou hodnotou Studentova t-testu ($t_{\text{krit.}} = 4,303$).

Tabulka 16: Vypočtené hodnoty t-testu s vyjádřením pro odrůdy černých rybízů z VSUO

Odrůda	t	Vyjádření
Ben Conan	25,612	výsledky nejsou shodné
Ben Gairn	4,530	výsledky nejsou shodné
Ben Hope	0,913	výsledky jsou shodné
Ben Lomond	25,832	výsledky nejsou shodné
Ceres	13,197	výsledky nejsou shodné
Démon	0,341	výsledky jsou shodné
Fokus	21,076	výsledky nejsou shodné
Lota	9,850	výsledky nejsou shodné
Morávia	8,880	výsledky nejsou shodné
Ometa	15,722	výsledky nejsou shodné
Ruben	13,366	výsledky nejsou shodné
Triton	11,634	výsledky nejsou shodné

Studentovým t-testem pro hladinu statistické významnosti $\alpha = 0,05$ (95 %) byla prokázána shodnost výsledků pouze u odrůd Ben Hope a Démon. Nejvyšší rozdíl hodnot byl vypočten u odrůdy Ben Lomond, a to 12,7 %.

Lze tedy konstatovat, že tvarové modifikace mají vliv na obsah FL. 8 z 12 odrůd černých rybízů z VSUO (66,6 %) obsahovalo více FL v tvarové modifikaci KEŘ (viz Graf 1).

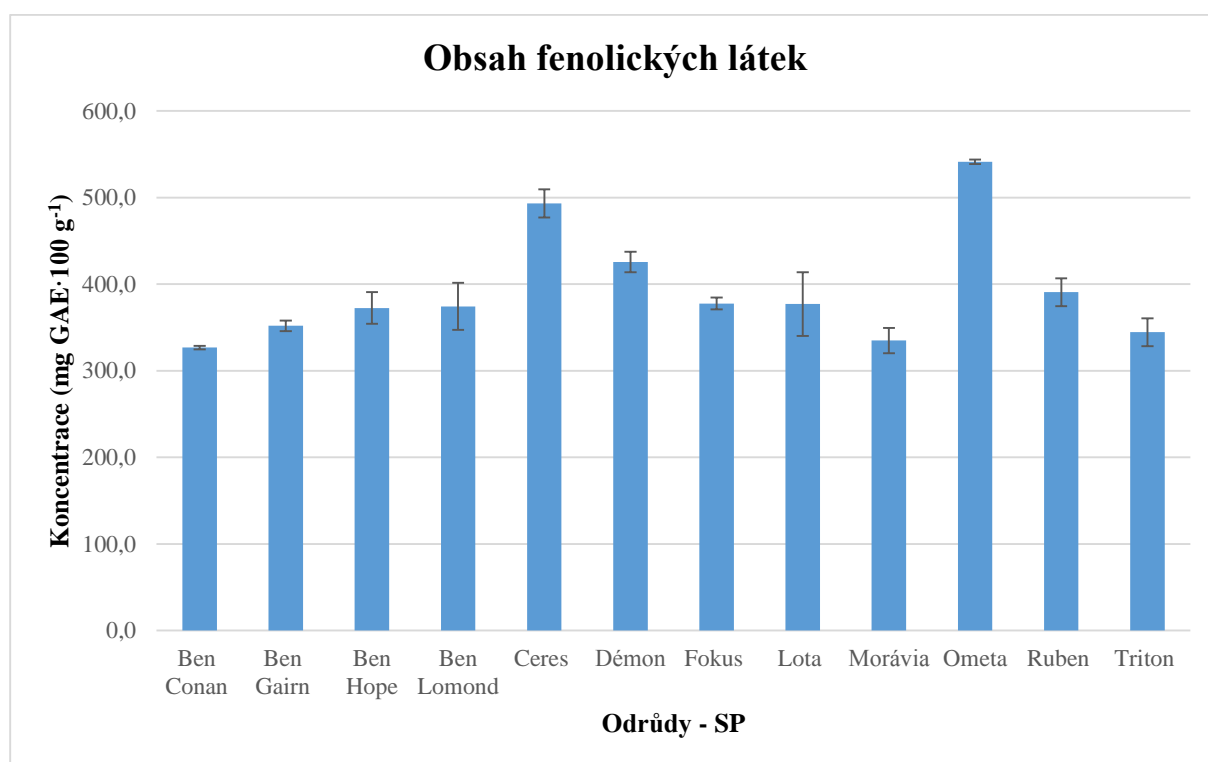
4.1.2 Stanovení fenolických látek ve vzorcích od soukromého pěstitele

V Tab. 17 jsou uvedeny průměrné naměřené hodnoty absorbancí vzorků a vypočtené hodnoty celkového obsahu fenolických látek (FL) s hodnotou intervalu spolehlivosti na hladině statistické významnosti 0,05.

Tabulka 17: Naměřené hodnoty absorpance a vypočtené hodnoty celkového obsahu FL ve šťávách černých rybízů od SP

Odrůda	Průměrné hodnoty absorpance (nm)	Celkový obsah FL (mg GAE·100 g ⁻¹)
Ben Conan	0,258	326,7 ± 2,0
Ben Gairn	0,279	351,9 ± 6,0
Ben Hope	0,243	372,5 ± 18,4
Ben Lomond	0,316	374,4 ± 27,2
Ceres	0,380	493,4 ± 16,3
Démon	0,304	425,7 ± 11,8
Fokus	0,277	377,7 ± 6,8
Lota	0,308	377,0 ± 36,8
Morávia	0,243	334,9 ± 14,6
Ometa	0,432	541,4 ± 2,7
Ruben	0,268	390,8 ± 16,1
Triton	0,238	344,5 ± 16,0

Pro lepší srovnání jednotlivých odrůd byl vytvořen Graf 2, kde jsou uvedeny hodnoty celkového obsahu FL s jejich intervalem spolehlivosti (jako chybové úsečky).



Graf 2: Porovnání obsahu fenolických látek odrůd černých rybízů od SP

Nejvyšší obsah fenolických látek byl stanoven v odrůdě Ometa 541,4 mg na 100 g plodů, naopak nejnižší obsah v odrůdě Ben Conan 326,7 mg na 100 g plodů. Obsah fenolických látek u zbylých odrůd se pohyboval v rozmezí 334,9–493,4 mg na 100 g plodů. Vyšší hodnoty obsahu

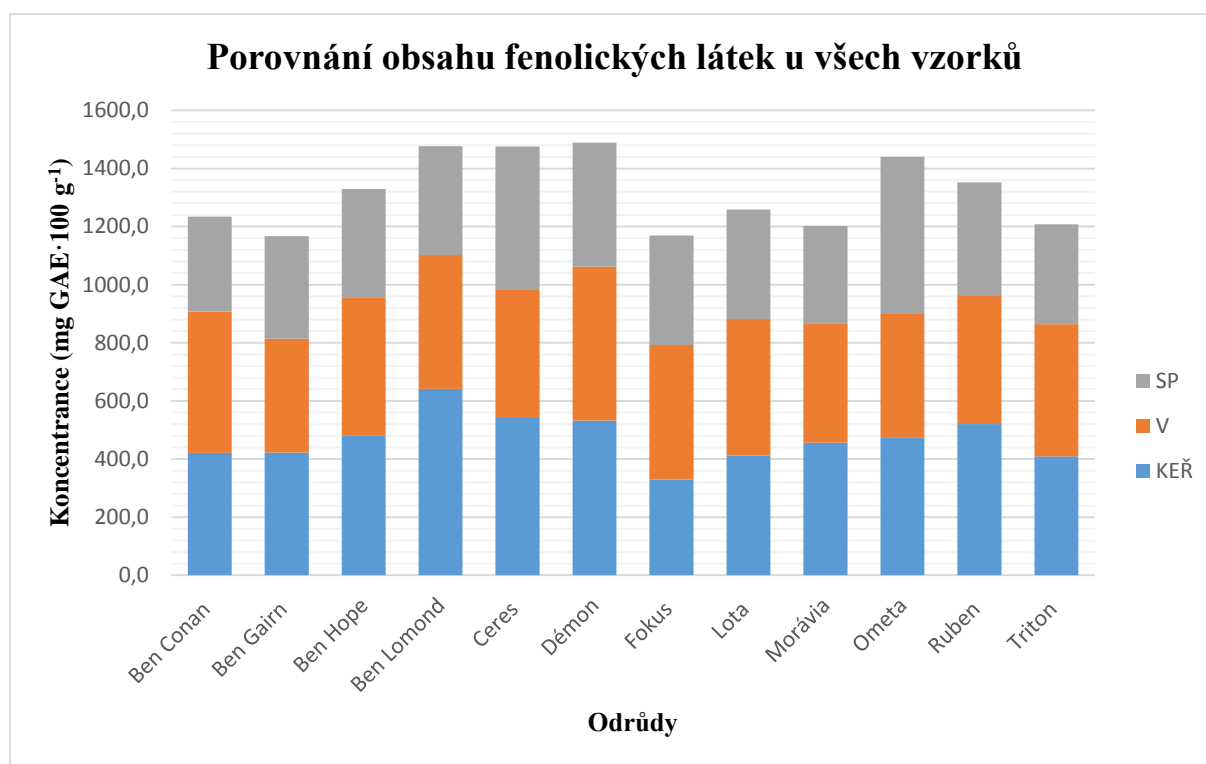
FL byly stanoveny u odrůd Ceres (493,4 mg·100 g⁻¹), Démon (425,7 mg·100 g⁻¹) a Ruben (390,8 mg·100 g⁻¹).

Všechny naměřené hodnoty vzorků od SP spadají do rozmezí hodnot FL uvedených v literatuře i přesto, že v našem postupu není zahrnuta extrakce FL ze slupek na rozdíl od literatury.

U vzorků odrůd černých rybízů od SP není možné provést Studentův t-test, protože SP sesbíral vypěstované tvarové modifikace KEŘ a V dohromady. Tento fakt mohl být jednou z příčin vyšších hodnot intervalu spolehlivosti (Tab. 17, Graf 2). Vzhledem k tomu, že vzorky od SP obsahují směs tvarových modifikací, nemůže provést porovnání mezi jednotlivými modifikacemi mezi odrůdami z VSUO a od SP.

4.1.3 Celkové porovnání odrůd na základě obsahu fenolických látek

V Grafu 3 je uvedena suma FL v jednotlivých odrůdách z VSUO (tvarové modifikace KEŘ i V) a od SP.



Graf 3: Celkové porovnání odrůd na obsah fenolických látek

Grafickým porovnáním jednotlivých odrůd (Graf 3) lze konstatovat, že odrůdy Démon, Ben Lomond a Ceres jsou nevíce perspektivní z hlediska obsahu FL. Odrůdy nejméně bohaté na FL jsou v tomto případě (Graf 3) Ben Gairn, Fokus a Morávia.

4.2 Stanovení celkového obsahu anthokyanů

Anthokyany ve šťávách černých rybízů byly stanovovány pH diferenciální metodou uvedenou v kapitole 3.3. V téže kapitole je uveden postup výpočtu celkového obsahu monomerního pigmentu (= anthokyanů). Výsledné koncentrace jsou uváděny v $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ čerstvých plodů. Získané výsledky byly statisticky zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2013 (kapitola 3.5).

Hlavním nekondenzovaným anthokyanem u černých rybízů je kyanindin 3-rutinosid (cca 40 %), následovaný delfinidinem 3-rutinosidem (cca 36 %) a delfinidinem 3-glukosidem (cca 14%). (32) Proto byl ve vztahu pro výpočet koncentrace monomerního pigmentu ($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) použit právě kyanidin 3-rutinosid.

V literatuře je uvedeno, že obsah anthokyanů v plodech černých rybízů by se měl pohybovat v rozmezí 168–613 $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ čerstvých plodů. (30)

4.2.1 Stanovení anthokyanů ve vzorcích z VSUO

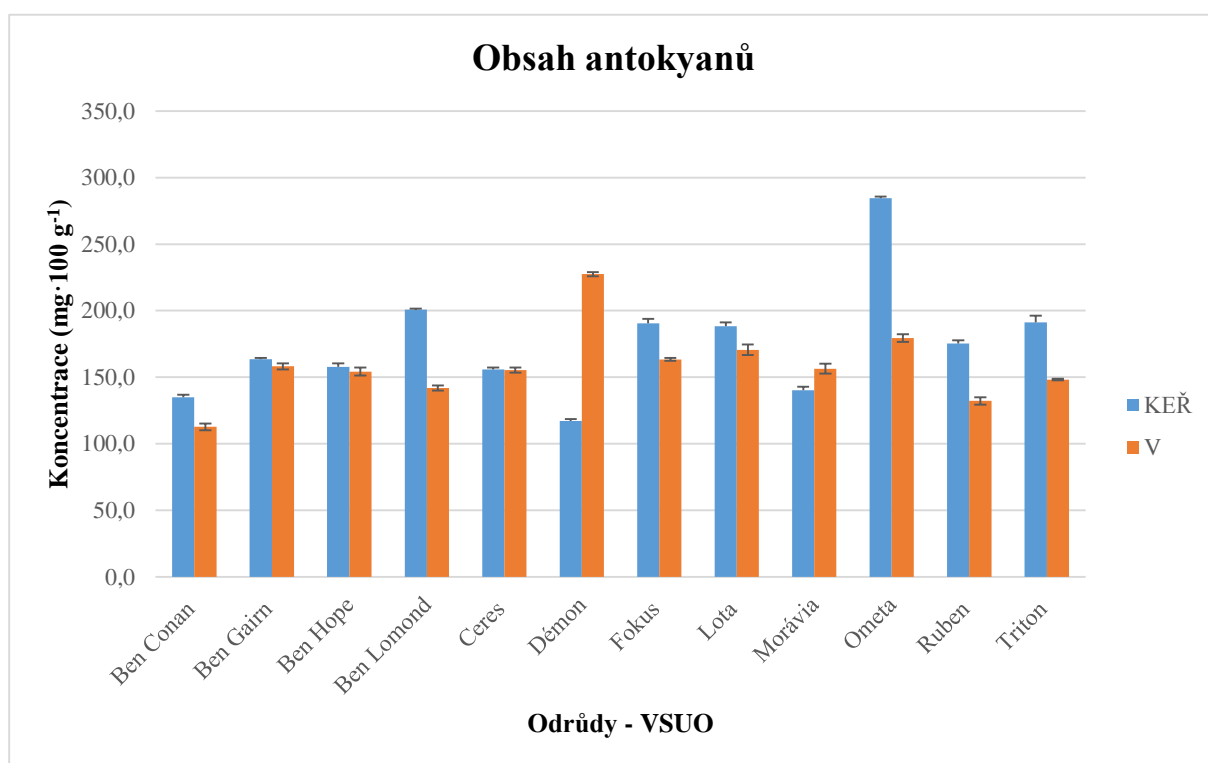
V Tab. 18 a 19 jsou uvedeny průměrné naměřené hodnoty absorbancí vzorků a vypočtené hodnoty celkového obsahu anthokyanů (jako monomerního pigmentu) s hodnotou intervalu spolehlivosti na hladině statistické významnosti 0,05. Pro přehledné porovnání jsou v Grafu 4 uvedeny hodnoty obsahu anthokyanů a jejich intervaly spolehlivosti (jako chybové úsečky).

Tabulka 18: Naměřené hodnoty absorbancí a vypočtené hodnoty celkového obsahu anthokyanů ve šťávách černých rybízů od SP

Odrůda	Průměrné hodnoty absorbance (nm)				Celkový obsah anthokyanů (mg·100 g ⁻¹)
	pH = 1		pH = 4,5		
	510	700	510	700	
Ben Conan	0,218	0,002	0,02	0,001	134,8 ± 2,0
Ben Gairn	0,269	0,005	0,031	0,006	163,6 ± 1,0
Ben Hope	0,261	0,001	0,023	0,002	157,8 ± 2,5
Ben Lomond	0,324	0,006	0,035	0,006	200,9 ± 0,6
Ceres	0,254	0,010	0,030	0,011	155,9 ± 1,5
Démon	0,172	0,000	0,017	0,002	117,1 ± 1,5
Fokus	0,283	0,001	0,029	0,002	190,4 ± 3,4
Lota	0,335	0,005	0,037	0,005	188,3 ± 2,9
Morávia	0,214	0,009	0,027	0,007	140,3 ± 2,5
Ometa	0,454	0,001	0,042	0,002	284,5 ± 1,4
Ruben	0,319	0,008	0,042	0,011	175,3 ± 2,4
Triton	0,296	0,001	0,032	0,004	191,1 ± 5,1

Tabulka 19: Naměřené hodnoty absorbancí a vypočtené hodnoty celkového obsahu anthokyanů ve šťávách černých rybízů tvarové modifikace V z VSUO

Odrůda	Průměrné hodnoty absorbance (nm)				Celkový obsah anthokyanů (mg·100 g ⁻¹)
	pH = 1		pH = 4,5		
	510	700	510	700	
Ben Conan	0,200	0,007	0,026	0,006	112,7 ± 2,5
Ben Gairn	0,237	0,000	0,021	0,000	158,1 ± 2,4
Ben Hope	0,246	0,003	0,023	0,003	154,2 ± 2,9
Ben Lomond	0,265	0,009	0,026	0,008	141,8 ± 2,0
Ceres	0,257	0,005	0,036	0,008	155,2 ± 1,9
Démon	0,391	0,007	0,040	0,009	227,4 ± 1,6
Fokus	0,246	0,005	0,034	0,007	163,4 ± 1,1
Lota	0,284	0,008	0,036	0,011	170,6 ± 4,0
Morávia	0,266	0,003	0,029	0,002	156,4 ± 3,7
Ometa	0,290	0,007	0,038	0,009	179,5 ± 2,9
Ruben	0,230	0,005	0,027	0,006	132,1 ± 2,7
Triton	0,242	0,010	0,033	0,009	148,2 ± 0,7



Graf 4: Porovnání obsahu anthokyanů odrůd černých rybízů (KEŘ i V) z VSUO

Nejvyšší obsah anthokyanů v tvarové modifikaci KEŘ byl stanoven v odrůdě Ometa 284,5 mg na 100 g plodů, naopak nejnižší obsah v odrůdě Démon 117,1 mg na 100 g plodů. Obsah anthokyanů u zbylých odrůd se pohyboval v rozmezí 134,8–200,9 mg na 100 g plodů. Vyšší hodnoty obsahu anthokyanů u modifikace KEŘ byly stanoveny u odrůd Ben Lomond (200,9 mg·100 g⁻¹), Triton (191,1 mg·100 g⁻¹) a Fokus (190,4 mg·100 g⁻¹).

Nejvyšší obsah anthokyanů v tvarové modifikaci V byl stanoven v odrůdě Démon 227,4 mg na 100 g plodů a naopak nejnižší obsah v odrůdě Ben Conan 112,7 mg na 100 g plodů. Obsah anthokyanů u zbylých odrůd se pohyboval v rozmezí 132,1–179,5 mg na 100 g plodů. Vyšší hodnoty obsahu anthokyanů u modifikace V byly stanoveny v odrůdách Ometa (179,5 mg·100 g⁻¹), Lota (170,6 mg·100 g⁻¹) a Fokus (163,4 mg·100 g⁻¹).

Více než polovina stanovených hodnot obsahu anthokyanů neodpovídá rozmezí hodnot z literatury. Námi stanovené hodnoty jsou nižší, protože v postupu neproběhla extrakce anthokyanových barviv ze slupky na rozdíl od literatury.

V Tab. 20 jsou uvedeny vypočtené hodnoty Studentova t-testu (t) pro porovnání shodnosti výsledků obsahu celkových anthokyanů mezi tvarovými modifikacemi KEŘ a V z VSUO. Dále je v tabulce vyjádření, zda jsou výsledky shodné či nikoliv v porovnání s tabelovanou hodnotou Studentova t-testu ($t_{\text{krit.}} = 4,303$).

Tabulka 20: Vypočtené hodnoty t-testu s vyjádřením pro odrůdy černých rybízů z VSUO

Odrůda	t	Vyjádření
Ben Conan	8,959	výsledky nejsou shodné
Ben Gairn	2,795	výsledky jsou shodné
Ben Hope	1,682	výsledky jsou shodné
Ben Lomond	37,009	výsledky nejsou shodné
Ceres	0,421	výsledky jsou shodné
Démon	72,951	výsledky nejsou shodné
Fokus	9,869	výsledky nejsou shodné
Lota	4,643	výsledky nejsou shodné
Morávia	4,668	výsledky nejsou shodné
Ometa	43,693	výsledky nejsou shodné
Ruben	15,463	výsledky nejsou shodné
Triton	10,761	výsledky nejsou shodné

Studentovým t-testem pro hladinu statistické významnosti $\alpha = 0,05$ (95 %) byla prokázána shodnost výsledků pouze u odrůd Ben Gairn, Ben Hope a Ceres. Nejvyšší rozdíl hodnot byl vypočten u odrůdy Ometa, a to 36,9 %.

Lze tedy konstatovat, že tvarové modifikace mají vliv na obsah anthokyanů. 10 z 12 odrůd černých rybízů z VSUO (83,3 %) obsahovalo více anthokyanů v tvarové modifikaci KEŘ (viz Graf 4). Na základě tohoto porovnání by se dalo říct, že tvarová modifikace KEŘ je příznivější pro tvorbu anthokyanů.

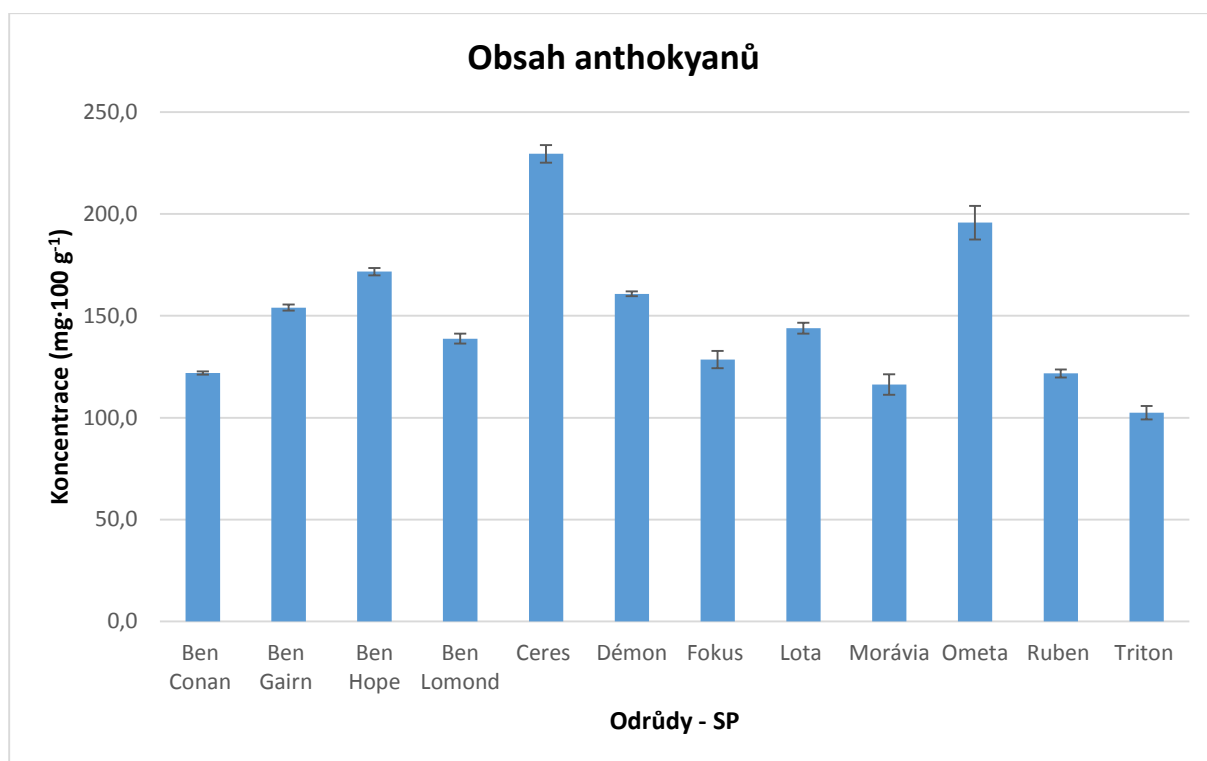
4.2.2 Stanovení anthokyanů ve vzorcích od SP

V Tab. 21 jsou uvedeny průměrné naměřené hodnoty absorbancí vzorků a vypočtené hodnoty celkového obsahu anthokyanů s hodnotou intervalu spolehlivosti na hladině statistické významnosti 0,05.

Tabulka 21: Naměřené hodnoty absorbancí a vypočtené hodnoty celkového obsahu anthokyanů ve šťávách černých rybízů od SP

Odrůda	Průměrné hodnoty absorbance (nm)				Celkový obsah anthokyanů (mg·100 g ⁻¹)
	pH = 1		pH = 4,5		
	510	700	510	700	
Ben Conan	0,208	0,002	0,020	0,005	122,0 ± 0,8
Ben Gairn	0,272	0,003	0,032	0,004	154,1 ± 1,5
Ben Hope	0,238	0,001	0,017	0,003	171,7 ± 1,9
Ben Lomond	0,263	0,006	0,035	0,007	138,8 ± 2,4
Ceres	0,373	0,003	0,034	0,006	229,5 ± 4,3
Démon	0,242	0,003	0,019	0,004	160,8 ± 1,2
Fokus	0,203	0,003	0,019	0,005	128,6 ± 4,2
Lota	0,258	0,006	0,028	0,006	143,9 ± 2,7
Morávia	0,223	0,002	0,015	0,001	116,3 ± 5,0
Ometa	0,340	0,008	0,040	0,009	195,7 ± 8,3
Ruben	0,185	0,006	0,020	0,005	121,7 ± 2,0
Triton	0,157	0,004	0,016	0,004	102,5 ± 3,3

Pro lepší srovnání jednotlivých odrůd byl vytvořen Graf 5, kde jsou uvedeny hodnoty celkového obsahu anthokyanů s jejich intervalem spolehlivosti (jako chybové úsečky).



Graf 5: Porovnání obsahu anthokyanů odrůd černých rybízů od SP

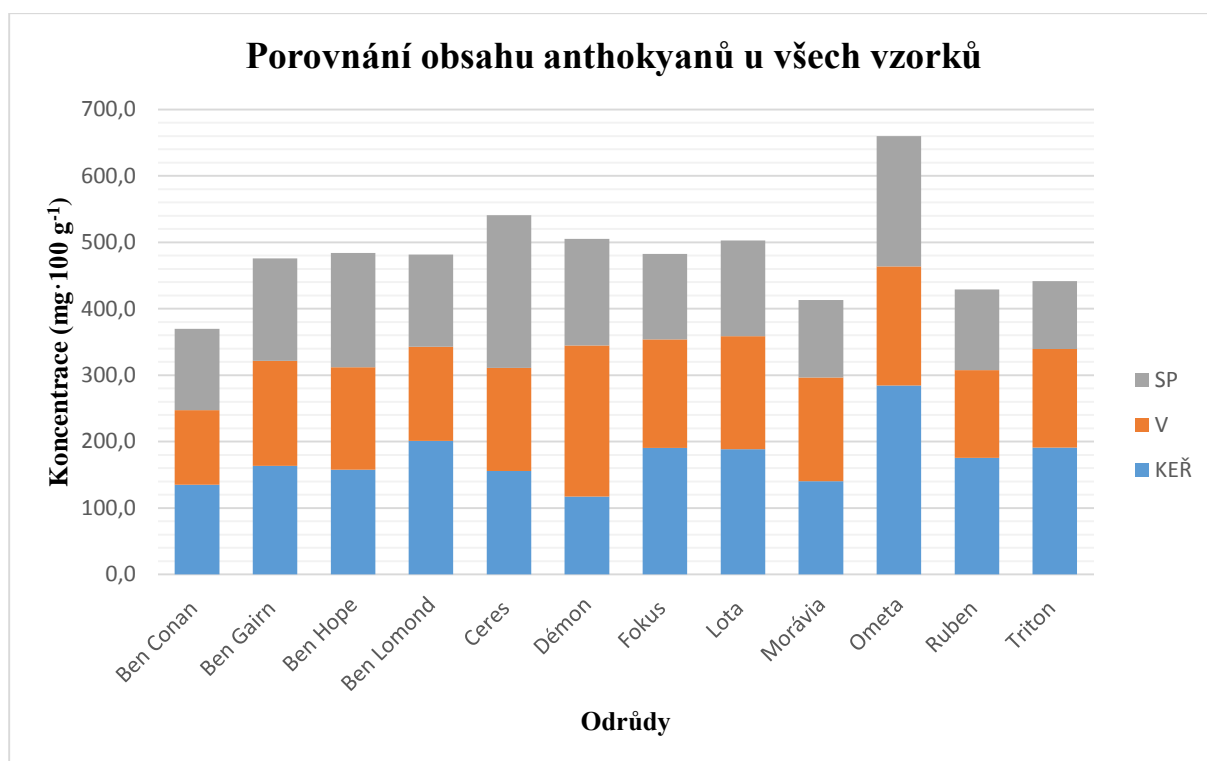
Nejvyšší obsah anthokyanů stanoven v odrůdě Ceres 229,5 mg na 100 g plodů, naopak nejnižší obsah v odrůdě Triton 102,5 mg na 100 g plodů. Obsah anthokyanů u zbylých odrůd se pohyboval v rozmezí 116,3–195,7 mg na 100 g plodů. Vyšší hodnoty obsahu anthokyanů byly stanoveny u odrůd Ometa (195,7 mg·100 g⁻¹), Ben Hope (171,7 mg·100 g⁻¹) a Ruben (160,8 mg·100 g⁻¹).

Většina stanovených hodnot obsahu anthokyanů neodpovídá rozmezí hodnot z literatury. Námi stanovené hodnoty jsou nižší, protože v postupu neproběhla extrakce anthokyanových barviv ze slupky na rozdíl od literatury.

U vzorků odrůd černých rybízů od SP není možné provést Studentův t-test, protože SP sesbíral vypěstované tvarové modifikace KEŘ a V dohromady. Vzhledem k tomu, že vzorky od SP obsahují směs tvarových modifikací, nemůže provést porovnání mezi jednotlivými modifikacemi mezi odrůdami z VSUO a od SP.

4.2.3 Celkové porovnání odrůd na základě obsahu anthokyanů

V Grafu 6 je uvedena suma anthokyanů v jednotlivých odrůdách z VSUO (tvarové modifikace KEŘ i V) a od SP.



Graf 6: Celkové porovnání odrůd na obsah anthokyanů

Grafickým porovnáním jednotlivých odrůd (Graf 6) lze konstatovat, že odrůdy Ometa, Ceres a Démon jsou nejvíce perspektivní z hlediska obsahu anthokyanů. Odrůdy nejméně bohaté na anthokyaniny jsou v tomto případě (Graf 6) Ben Conan, Morávia a Ruben.

4.3 Stanovení obsahu vitamínu C

Pro stanovení kyseliny askorbové existuje celá řada postupů (viz kapitola 2.3.5). Nejpočastěji je HPLC metoda. HPLC metoda nejčastěji používá reverzní fázi, jako mobilní fázi fosfátový pufr s methanolem a jako extrakční činidlo kyselinu monohydrogenfosforečnou. Metoda stanovení kyseliny askorbové je použita dle normy a postup je uveden v kapitole 3.4. (76) Integrace ploch piků probíhala v programu Agilent (offline).

Kalibrační křivka kyseliny askorbové byla připravena také podle kapitoly 3.5. Za pomoci regresní rovnice kalibrační křivky byl vypočítán obsah askorbové kyseliny v jednotlivých vzorcích šťáv. Výsledné koncentrace jsou uváděny v $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ čerstvých plodů. Získané výsledky byly statisticky zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2013 (kapitola 3.5).

V literatuře je uvedeno, že obsah kyseliny askorbové v plodech černých rybízů by se měl pohybovat v rozmezí $60\text{--}270 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ čerstvých plodů. (9)

Grafy kalibračních křivek kyseliny askorbové jsou uvedeny v příloze č. 2. Kalibrační závislosti jsou ve studovaném rozsahu lineární. Regresní koeficienty R^2 jsou vyšší než 0,99, což značí velmi dobrou linearitu. Dvě kalibrační křivky byly vytvořeny z důvodu výměny průtočné cely detektoru. Prvních 14 dní se pracovalo s průtočnou celou s menší délkou. Všechny hodnoty naměřené touto průtočnou celou jsou v textu označeny hvězdičkou (*).

Příklad chromatogramu je uveden v příloze 3. Je na něm znázorněn pík kyseliny askorbové stanovované u odrůdy Ceres tvarové modifikace V z VSUO, která obsahovala nejvíce vitamínu C.

4.3.1 Stanovení obsahu askorbové kyseliny ve vzorcích z VSUO

V Tab. 22 a 23 jsou uvedeny průměrné naměřené hodnoty ploch píků vzorků a vypočtené hodnoty obsahu askorbové kyseliny s hodnotou intervalu spolehlivosti na hladině statistické významnosti 0,05.

Tabulka 22: Naměřené hodnoty ploch píků a vypočtené hodnoty obsahu kyseliny askorbové ve šťávách černých rybízů tvarové modifikace KER z VSUO

Odrůda	Průměrné hodnoty ploch píků ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	Obsah kyseliny askorbové ($\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$)
Ben Conan	2538,3	$204,7 \pm 1,2$
Ben Gairn	2556,6	$151,9 \pm 3,5$
Ben Hope	478,9*	$276,3 \pm 10,6$
Ben Lomond	2686,7	$199,9 \pm 1,2$
Ceres	380,9*	$220,3 \pm 9,1$
Démon	2537,6	$142,1 \pm 3,3$
Fokus	234,7*	$144,0 \pm 2,8$
Lota	328,5*	$153,7 \pm 3,9$
Morávia	2295,4	$176,2 \pm 5,6$
Omata	266,3*	$144,3 \pm 2,7$
Ruben	335,8*	$209,7 \pm 0,9$
Triton	1924,5	$141,2 \pm 1,6$

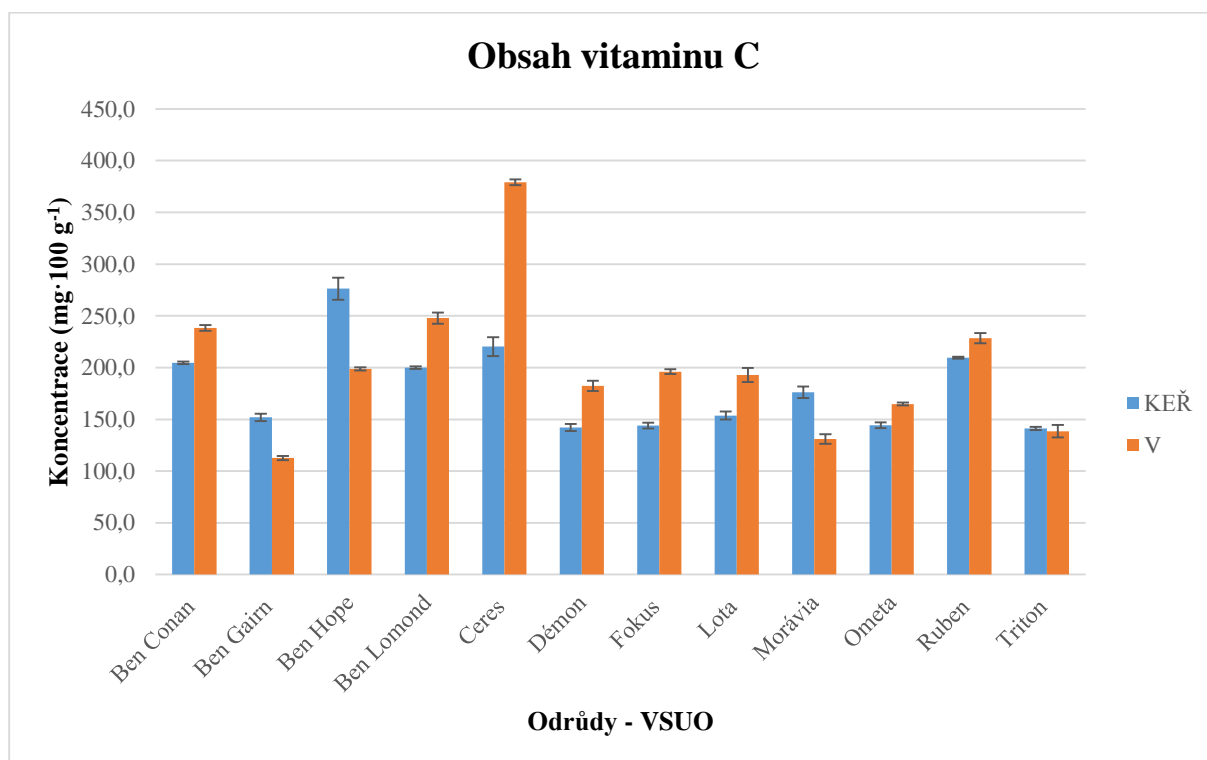
Tabulka 23: Naměřené hodnoty ploch píků a vypočtené hodnoty obsahu kyseliny askorbové ve šťávách černých rybízů tvarové modifikace V z VSUO

Odrůda	Průměrné hodnoty ploch píků ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	Obsah kyseliny askorbové ($\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$)
Ben Conan	413,9*	$238,2 \pm 2,8$
Ben Gairn	1491,1	$112,6 \pm 1,9$
Ben Hope	419,9*	$198,8 \pm 1,5$
Ben Lomond	509,9*	$247,9 \pm 5,4$
Ceres	728,4*	$379,1 \pm 2,9$
Démon	2298,2	$182,4 \pm 4,8$
Fokus	337,7*	$196,0 \pm 2,4$
Lota	380,1*	$192,8 \pm 6,8$
Morávia	1642,6	$131,1 \pm 4,7$
Omata	316,8*	$164,9 \pm 1,5$

Odrůda	Průměrné hodnoty ploch píků ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	Obsah kyseliny askorbové ($\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$)
Ruben	411,5	$228,5 \pm 5,0$
Triton	2514,7	$138,5 \pm 6,0$

* byla použita jiná průtočná cela, viz 3.4.3

Pro přehledné porovnání jsou v Grafu 7 uvedeny hodnoty obsahu kyseliny askorbové a jejich intervaly spolehlivosti (jako chybové úsečky).



Graf 7: Porovnání obsahu kyseliny askorbové odrůd černých rybízů (KEŘ i V) z VSUO

Nejvyšší obsah askorbové kyseliny v tvarové modifikaci KEŘ byl stanoven u odrůdy Ben Hope 276,3 mg na 100 g plodů, naopak nejnižší obsah v odrůdě Triton 141,2 mg na 100 g plodů. Obsah kyseliny askorbové u zbylých odrůd se pohyboval v rozmezí 142,1–220,3 mg na 100 g plodů. Vyšší hodnoty obsahu askorbové kyseliny u modifikace KEŘ byly stanoveny také u odrůd Ceres (220,3 $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$), Ruben (209,7 $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$) a Ben Conan (204,7 $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$).

Nejvyšší obsah kyseliny askorbové v tvarové modifikaci V byl stanoven u odrůdy Ceres 379,1 mg na 100 g plodů a naopak nejnižší obsah v odrůdě Ben Gairn 112,6 mg na 100 g plodů. Obsah kyseliny askorbové u zbylých odrůd se pohyboval v rozmezí 131,1–247,9 mg na 100 g plodů. Vyšší hodnoty obsahu kyseliny askorbové u modifikace V byly stanoveny v odrůdách Ben Lomond (247,9 $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$), Ben Conan (238,2 $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$) a Ruben (228,5 $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$).

Většina stanovených hodnot obsahu kyseliny askorbové odpovídala rozmezí hodnot uvedené v literatuře. Pouze odrůda Ceres tvarové modifikace V z VSUO obsahovala přibližně o 100 $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ více kyseliny askorbové než uvádí literatura.

V Tab. 24 jsou uvedeny vypočtené hodnoty Studentova t-testu (t) pro porovnání shodnosti výsledků obsahu kyseliny askorbové mezi tvarovými modifikacemi KEŘ a V z VSUO. Dále je v tabulce vyjádření, zda jsou výsledky shodné či nikoliv v porovnání s tabelovanou hodnotou Studentova t-testu ($t_{\text{krit.}} = 4,303$).

Tabulka 24: Vypočtené hodnoty t-testu s vyjádřením pro odrůdy černých rybízů z VSUO

Odrůda	t	Vyjádření
Ben Conan	17,579	výsledky nejsou shodné
Ben Gairn	15,696	výsledky nejsou shodné
Ben Hope	11,578	výsledky nejsou shodné
Ben Lomond	13,923	výsledky nejsou shodné
Ceres	26,511	výsledky nejsou shodné
Démon	11,428	výsledky nejsou shodné
Fokus	22,833	výsledky nejsou shodné
Lota	9,326	výsledky nejsou shodné
Morávia	10,432	výsledky nejsou shodné
Ometa	10,653	výsledky nejsou shodné
Ruben	6,005	výsledky nejsou shodné
Triton	0,693	výsledky jsou shodné

Studentovým t-testem pro hladinu statistické významnosti $\alpha = 0,05$ (95 %) byla prokázána shodnost výsledků pouze u odrůdy Triton. Nejvyšší rozdíl hodnot byl vypočten u odrůdy Ceres, a to 36,9 %.

Lze tedy konstatovat, že tvarové modifikace mají vliv na obsah kyseliny askorbové. 8 z 12 odrůd černých rybízů z VSUO (66,6 %) obsahovalo více askorbové kyseliny v tvarové modifikaci V (viz Graf 4).

4.3.2 Stanovení kyseliny askorbové ve vzorcích od SP

V Tab. 25 jsou uvedeny průměrné naměřené hodnoty ploch píků vzorků a vypočtené hodnoty obsahu kyseliny askorbové s hodnotou intervalu spolehlivosti na hladině statistické významnosti 0,05.

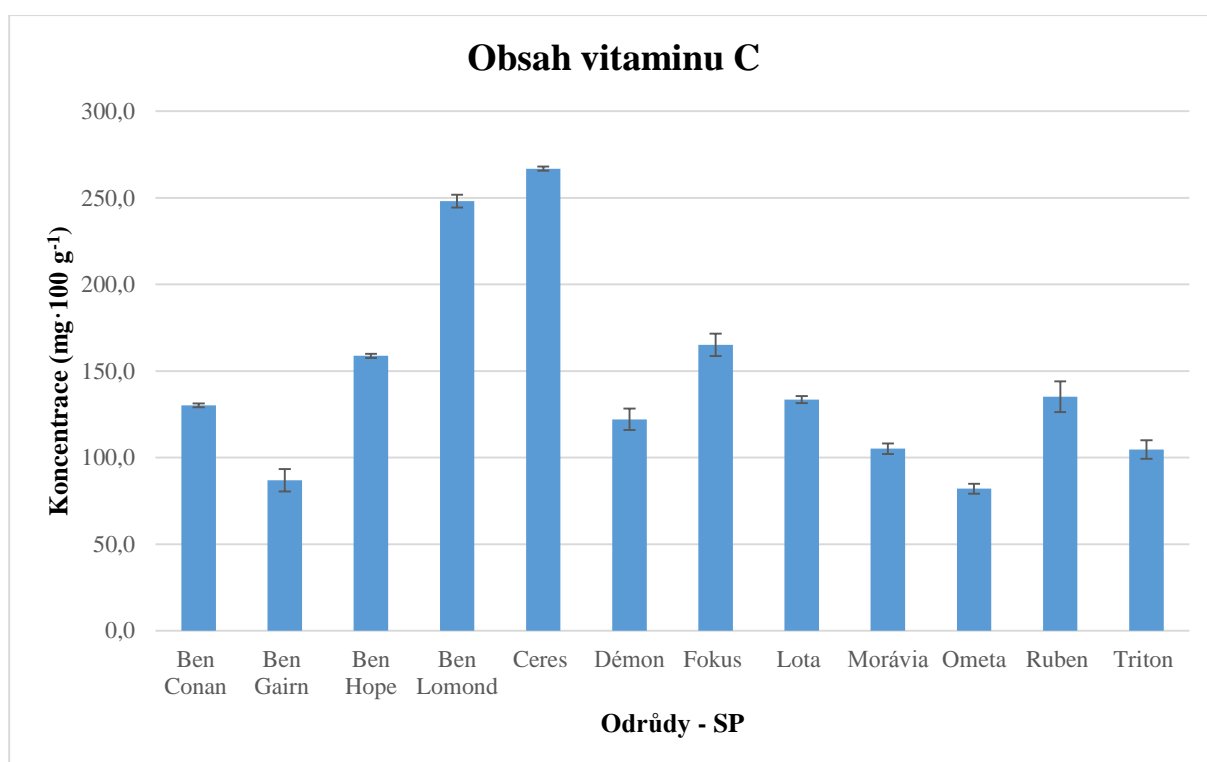
Tabulka 25: Naměřené hodnoty ploch píků a vypočtené hodnoty obsahu kyseliny askorbové ve šťávách černých rybízů od SP

Odrůda	Průměrné hodnoty ploch píků ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	Obsah kyseliny askorbové ($\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$)
Ben Conan	1869,3	$130,2 \pm 1,1$
Ben Gairn	1115,6	$87,0 \pm 6,5$
Ben Hope	2307,6	$158,8 \pm 1,2$
Ben Lomond	541,6*	$248,1 \pm 3,7$
Ceres	4275,6	$266,9 \pm 1,2$
Démon	1999,2	$122,1 \pm 6,3$

Odrůda	Průměrné hodnoty ploch píků ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	Obsah kyseliny askorbové ($\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$)
Fokus	2147,8	$165,1 \pm 6,4$
Lota	1903,1	$133,5 \pm 2,0$
Morávia	1357,8	$105,1 \pm 3,1$
Ometa	1087,8	$82,0 \pm 2,8$
Ruben	1995,8	$135,1 \pm 8,9$
Triton	1192,7	$104,7 \pm 5,4$

* byla použita jiná průtočná cela, viz 3.4.3

Pro lepší srovnání jednotlivých odrůd byl vytvořen Graf 8, kde jsou uvedeny hodnoty obsahu askorbové kyseliny s jejich intervalem spolehlivosti (jako chybové úsečky).



Graf 8: Porovnání obsahu askorbové kyseliny odrůd černých rybízů od SP

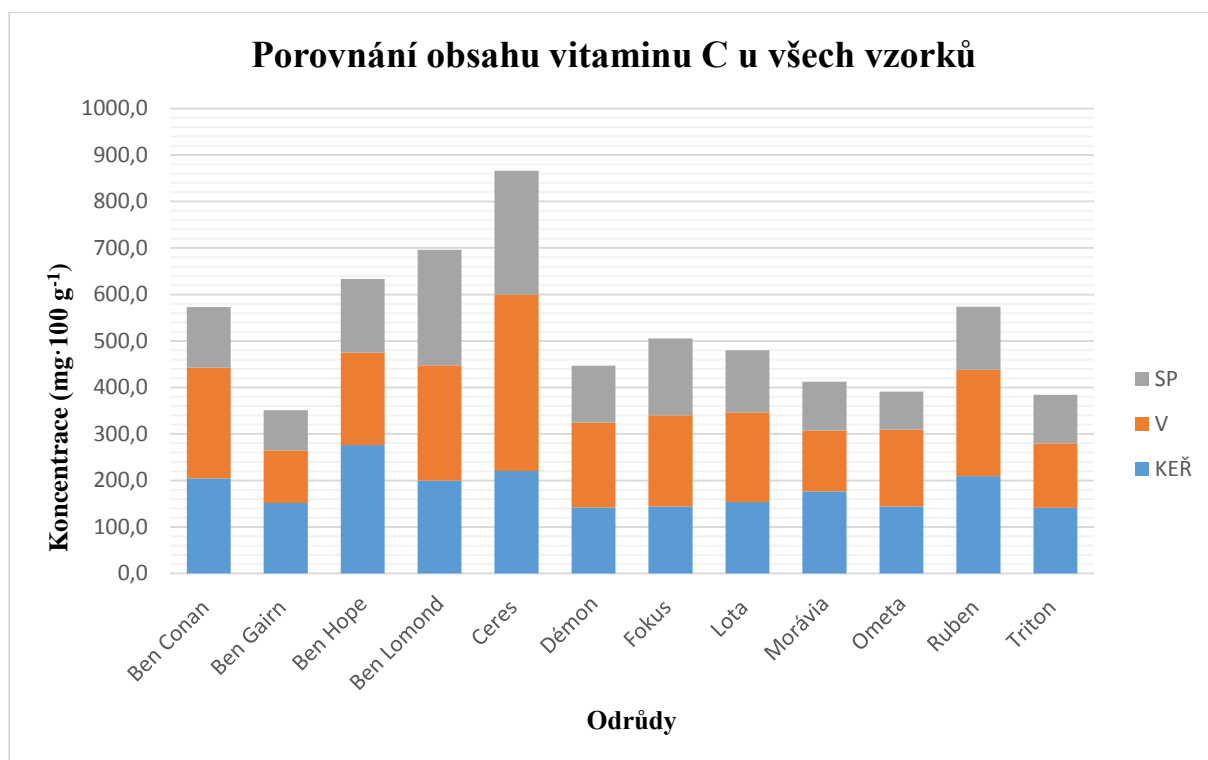
Nejvyšší obsah kyseliny askorbové byl stanoven v odrůdě Ceres 266,9 mg na 100 g plodů, naopak nejnižší obsah v odrůdě Ometa 82,0 mg na 100 g plodů. Obsah kyseliny askorbové u zbylých odrůd se pohyboval v rozmezí 87,0–248,1 mg na 100 g plodů. Vyšší hodnoty obsahu kyseliny askorbové byly stanoveny u odrůd Ben Lomond ($248,1\text{ mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$), Fokus ($171,7\text{ mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$) a Ben Hope ($158,8\text{ mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$).

Všechny stanovené hodnoty obsahu kyseliny askorbové odpovídají rozmezí hodnot z literatury.

U vzorků odrůd černých rybízů od SP není možné provést Studentův t-test, protože SP sesbíral vypěstované tvarové modifikace KEŘ a V dohromady. Vzhledem k tomu, že vzorky od SP obsahují směs tvarových modifikací, nemůže provést porovnání mezi jednotlivými modifikacemi mezi odrůdami z VSUO a od SP.

4.3.3 Celkové porovnání odrůd na základě obsahu kyseliny askorbové

V Grafu 9 je uvedena suma obsahu kyseliny askorbové v jednotlivých odrůdách z VSUO (tvarové modifikace KEŘ i V) a od SP.



Graf 9: Celkové porovnání odrůd na obsah kyseliny askorbové

Grafickým porovnáním jednotlivých odrůd (Graf 9) lze konstatovat, že odrůdy Ceres, Ben Lomond a Ben Hope jsou nevíce perspektivní z hlediska obsahu kyseliny askorbové. Odrůdy nejméně bohaté na kyselinu askorbovou jsou v tomto případě (Graf 9) Ben Gairn, Triton a Ometa.

5 ZÁVĚR

Plody černého rybízu jsou významným zdrojem fenolických látek a vitamínu C. Tyto látky se řadí k antioxidantům a jsou velmi prospěšné lidskému zdraví. Proto byla tato diplomová práce věnována posouzení obsahu uvedených biologicky aktivních látek ve vybraných moderních odrůdách černého rybízu.

Teoretická část diplomové práce je rozdělena na tři základní kapitoly. První kapitola informuje o černém rybízu. Je v ní popsána rostlina černého rybízu, obsah látek v plodech a využití plodů pro potravinářské účely. Další kapitola se věnuje charakterizaci fenolických látek a metodám jejich stanovení. Poslední kapitola této části je orientována na popis, vlastnosti a postupy stanovení vitamínu C.

Náplní této diplomové práce bylo stanovení obsahu celkových fenolických látek, antokyanových barviv a obsah vitamínu C ve všech dodaných odrůdách černých rybízů. Pro analýzy bylo vybráno celkem 12 odrůd pěstovaných na dvou stanovištích a ve dvou tvarových modifikacích (KEŘ a V). Z výsadby VSUO byly dodány odděleně vzorky plodů z obou tvarových modifikací. Bylo proto možné srovnávat stanovená množství obsahových látek plodů, aby se zjistilo, zda tvar keře má vliv na množství sekundárních metabolitů produkovaných rostlinou. Z výsadby soukromého pěstitele byla dodána směs plodů z obou tvarových modifikací, a proto nebylo možné toto srovnání provést.

Nejvyšší obsah fenolických látek v tvarové modifikaci KEŘ černého rybízu z VSUO byl stanoven v odrůdě Ben Lomond ($641,4 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) a naopak nejnižší v odrůdě Fokus ($329,7 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). U tvarové modifikace V černého rybízu z VSUO bylo nejvíce fenolických látek stanoveno v odrůdě Démon ($530,3 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) a naopak nejméně bylo stanoveno v odrůdě Ben Gairn ($391,9 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$).

Při porovnání shodnosti výsledků obsahu celkových fenolických látek u tvarových modifikací KEŘ a V z VSUO bylo zjištěno, že pouze dvě odrůdy jsou shodné (Ben Hope a Démon).

U soukromého pěstitele byla odrůdou s nejvyšším obsahem fenolických látek Ometa ($541,4 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) a s nejnižším Ben Conan ($326,7 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$).

Všechny naměřené hodnoty fenolických látek spadají do rozmezí hodnot uvedených v literatuře. Celkovým porovnáním odrůd na obsah fenolických látek bylo zjištěno, že odrůdy Démon, Ben Lomond a Ceres jsou nejvíce perspektivní z hlediska obsahu fenolických látek.

Nejvíce anthokyanů v tvarové modifikaci KEŘ z VSUO bylo stanoveno v odrůdě Ometa ($284,5 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) a nejméně v odrůdě Démon ($117,1 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Nejvyšší obsah anthokyanů u tvarové modifikaci V byl stanoven v odrůdě Démon ($227,4 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) a naopak nejnižší v odrůdě Ben Conan ($112,7 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$).

Při porovnání shodnosti výsledků obsahu celkových anthokyanů u tvarových modifikací KEŘ a V z VSUO bylo zjištěno, že pouze odrůdy Ben Gairn, Ben Hope a Ceres jsou shodné.

Nejvyšší obsah anthokyanů u vzorků od soukromého pěstitele byl stanoven v odrůdě Ceres ($229,5 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), naopak nejnižší obsah v odrůdě Triton ($102,5 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$).

Většina stanovených hodnot obsahu antokyanů neodpovídá rozmezí hodnot z literatury. Stanovené hodnoty jsou nižší, protože ze slupek plodů nebyly extrahovány antokyanová barviva. V literatuře jsou uváděna široká rozmezí obsahu antokyanů černých rybízů $168\text{--}613 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Celkovým porovnáním odrůd z hlediska obsahu antokyanů bylo zjištěno, že nejlepšími odrůdami jsou Ometa, Ceres a Démon.

Největší zastoupení askorbové kyseliny bylo zjištěno v tvarové modifikaci KEŘ z VSUO u odrůdy Ben Hope ($276,3 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Nejmenší zastoupení kyseliny askorbové bylo zjištěno v odrůdě Triton ($141,2 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$). Nejvíce vitaminu C v tvarové modifikaci V z VSUO bylo zjištěno v odrůdě Ceres ($379,1 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) a nejméně v odrůdě Ben Gairn ($112,6 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$).

Při porovnání shodnosti výsledků obsahu askorbové kyseliny u tvarových modifikací KEŘ a V z VSUO bylo zjištěno, že pouze odrůda Triton je shodná.

Nejvyšší obsah askorbové kyseliny u vzorků od soukromého pěstitele byl zjištěn v odrůdě Ceres ($266,9 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$) a nejnižší v odrůdě Ometa ($82,0 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$).

S výjimkou jednoho vzorku všechny stanovené hodnoty odpovídaly rozmezí hodnot z literatury. Černý rybíz je ovocem s velmi vysokým obsahem vitaminu C (kolem $166 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$), proto by měl být zařazen do jídelníčku každého člověka. Celkovým porovnáním všech odrůd z hlediska obsahu askorbové kyseliny bylo zjištěno, že odrůdy Ceres, Ben Lomond a Ben Hope jsou nejvíce perspektivní.

Obsah celkových fenolických látek ve všech vzorcích se pohyboval v rozmezí $326,7\text{--}641,4 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. Obsah celkových anthokyanů ve všech vzorcích byl analyzován v rozmezí $102,5\text{--}284,5 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$. A obsah vitaminu C ve všech vzorcích byl v rozmezí $82,0\text{--}379,1 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$.

Při porovnávání tvarových modifikací KEŘ a V z VSOU nebyla prokázána shodnost výsledků stanovení. Z celkových 36 Studentových t-testů shodnosti byla pouze u 6 případů prokázána shoda výsledků (cca 17 %). Z tohoto zjištění vyplývá, že tvar keře ovlivňuje množství sledovaných biologicky aktivních látek produkovaných rostlinou.

Celkovým porovnáním jednotlivých odrůd na obsahy celkových fenolických látek, celkových antokyanů a vitaminu C bylo zjištěno, že odrůda Ceres je nejvíce perspektivní. Tato odrůda vždy patřila mezi tři nejlepší odrůdy z hlediska obsahu fenolických látek, antokyanů i vitaminu C. Dalšími perspektivními odrůdami jsou Ben Hope, Ben Lomond, Démon a Ometa.

Tato práce byla finančně podpořena projektem NAZV č. QI111A141 Výzkum nových technologií v pěstování angreštu a rybízu se zaměřením na kvalitu a využití plodů.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Welcome to the PLANTS Database: USDA PLANTS [online]. Last revision 2009 [cit. 2015-04-16]. Classification. Dostupné z: <http://plants.usda.gov/java/>
- [2] HRIČOVSKÝ, I. *Technológia pestovania ríbezlí*. 1. vyd. Bratislava: Príroda, 1982, 74 s.
- [3] MÖLLEROVÁ, J. Homo botanicus: Ruel, Jean. *BOTANY.cz* [online]. 2011 [cit. 2015-04-26]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/ruel/>
- [4] HRIČOVSKÝ, I. *Rybíz, angrešt na zahrádce*. 2. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1990, 52 s.
- [5] NEČAS, T., B. KRŠKA a I. ONDRÁŠEK. Multimediální učební skriptum ovocnictví. *Rybíz* [online]. MZU, 2004 [cit. 2015-04-21]. Dostupné z: http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav_551/eltronic_ovoc/_private/ovoc_1/data/rybiz.pdf
- [6] HARANT, M. a V. ZACHA. *Pěstujeme bobuloviny*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1974, 258, [6] s., obr. příl.
- [7] NESRSTA, D., T. JAN a M. HANČ. *Drobné ovoce a skořápkoviny: přes 140 barevných fotografií a popisů odrůd*. 1. vyd. Olomouc: Baštan, 2013, 213 s. ISBN 978-80-87091-40-1
- [8] BARNEY, D. L. a K. E. HUMMER. *Currants, gooseberries, and jostaberries: a guide for growers, marketers, and researchers in North America*. New York: Food Products Press, c2005, xiii, 266 p. ISBN 15-602-2297-2
- [9] WALKER, P. G., R. VIOLA, M. WOODHEAD, R. M. BRENNAN a R. D. HANCOCK. Ascorbic acid content of blackcurrant fruit is influenced by both genetic and environmental factors. *Funct. Plant Sci. Biotechnol* [online]. 2010, č. 4, s. 40-52 [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: http://www.northsearegion.eu/files/repository/20131027214425_UK-Enclosures28.pdf
- [10] Seznam odrůd: zapsaných ve Státní odrůdové knize k 15. 6. 2014. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský [online]. 2014 [cit. 2015-04-28]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/odrudy/informace-o-odrudah/>
- [11] Databáze složení potravin ČR verze 4.13: Ústav zemědělské ekonomiky a informací a Výzkumný ústav potravinářský. *Nutridatabase.cz: Databáze složení potravin pro Českou republiku* [online]. Praha, 2013 [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://www.nutridatabase.cz/>
- [12] ZEMPLENI, J. *Handbook of vitamins*. 4th ed. Boca Raton: Taylor, c2007, xii, 593 p. ISBN 08-493-4022-5
- [13] SMĚRNICE KOMISE 2008/100/ES. In: *Úřední věstník Evropské unie*. 2008. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/>
- [14] OCHMIAN, I., A. DOBROWOLSKA a P. CHEŁPIŃSKI. Physical Parameters and Chemical Composition of Fourteen Blackcurrant Cultivars (*Ribes nigrum* L.). *Notulae*

- botanicae Horti agrobotanici Cluj-Napoca*. 2014, roč. 42, č. 1, s. 160-167 [cit. 2015-04-21]. Dostupné z: <http://www.notulaeobotanicae.ro/index.php/nbha/article/view/9103>
- [15] VARMING, C., M. A. PETERSEN a L. POLL. Comparison of Isolation Methods for the Determination of Important Aroma Compounds in Black Currant (*Ribes nigrum* L.) Juice, Using Nasal Impact Frequency Profiling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004, vol. 52, issue 6, s. 1647-1652. DOI: 10.1021/jf035133t. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf035133t>
- [16] VELÍŠEK, J. a J. HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin II*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 2 sv. ISBN 978-80-86659-16-9
- [17] Vlákna. *Společnost pro výživu* [online]. 2009 [cit. 2015-04-24]. Dostupné z: <http://www.vyzivaspol.cz/encyklopedie-vyzivy-v.html>
- [18] GWANPUA, S. G., S. VAN BUGGENHOUT, B. E. VERLINDEN, S. CHRISTIAENS, A. SHPIGELMAN, V. VICENT, Z. J. KERMANI, B. M. NICOLAI, M. HENDRICKX a A. GEERAERD. Pectin modifications and the role of pectin-degrading enzymes during postharvest softening of Jonagold apples. *Food Chemistry*. 2014, vol. 158, s. 283-291. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.02.138. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614003239>
- [19] FAOSTAT: *Food and Agriculture Organization of the United Nations - Production Data Archives* [online]. 2015 [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: <http://faostat.fao.org/>
- [20] EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to food (ANS) . Scientific Opinion on the re-evaluation of anthocyanins (E 163) as a food additive. *EFSA Journal*. 2013; 11(4):3145 [51 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2013.3145; Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal
- [21] HELENO, S. A., A. MARTINS, M. J. R. P. QUEIROZ a I. C. F. R. FERREIRA. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds. *Food Chemistry*. 2015, vol. 173, s. 501-513. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.10.057. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614016197>
- [22] SOTO-VACA, A., A. GUTIERREZ, J. N. LOSSO, Z. XU a J. W. FINLEY. Evolution of Phenolic Compounds from Color and Flavor Problems to Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012-07-11, vol. 60, issue 27, s. 6658-6677. DOI: 10.1021/jf300861c. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf300861c>
- [23] GOPALAN, A., S. C. REUBEN, S. AHMED, A. S. DARVESH, J. HOHMANN a A. BISHAYEE. The health benefits of blackcurrants. *Food*. 2012, vol. 3, issue 8, s. 795-. DOI: 10.1039/c2fo30058c. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2fo30058c>
- [24] KARJALAINEN, R., M. ANTONEN, N. SAVIRANTA, D. STEWART, G. J. MCDOUGALL, P. MATTILA a R. TÖRRÖNEN. A review on bioactive compounds in black currants (*ribes nigrum* l.) And their potential health-promoting properties. *Proceedings of the First International Symposium on Biotechnology of Fruit Species* [online]. 2009, č. 839, s. 301-307 [cit. 2015-04-24]. Dostupné z: http://www.actahort.org/books/839/839_38.htm
- [25] MCDOUGALL, G. J. a D. STEWART. Berries and Health: A review of the evidence. *Food and health innovation service* [online]. 2012, č. 1 [cit. 2015-04-25].

Dostupné z: https://djfextranet.agrscl.dk/sites/climafruit/offentligt/Documents/UK-Enclosure53_sep12.pdf

- [26] MANGANARIS, G. A., V. GOULAS, A. R. VICENTE a L. A. TERRY. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2014-03-30, vol. 94, issue 5, s. 825-833 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1002/jsfa.6432. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.6432>
- [27] PAREDES-LÓPEZ, O., M. L. CERVANTES-CEJA, M. VIGNA-PÉREZ a T. HERNÁNDEZ-PÉREZ. Berries: Improving Human Health and Healthy Aging, and Promoting Quality Life—A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2010, vol. 65, issue 3, s. 299-308. DOI: 10.1007/s11130-010-0177-1. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11130-010-0177-1>
- [28] ZADERNOWSKI, R., M. NACZK a J. NESTEROWICZ. Phenolic Acid Profiles in Some Small Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2005, vol. 53, issue 6, s. 2118-2124 [cit. 2015-04-25]. DOI: 10.1021/jf040411p. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf040411p>
- [29] JIMENEZ-GARCIA, S. N., R. G. GUEVARA-GONZALEZ, R. MIRANDA-LOPEZ, A. A. FERREGRINO-PEREZ, I. TORRES-PACHECO a M. A. VAZQUEZ-CRUZ. Functional properties and quality characteristics of bioactive compounds in berries: Biochemistry, biotechnology, and genomics. *Food Research International* [online]. 2013, vol. 54, issue 1, s. 1195-1207 [cit. 2015-04-21]. DOI: 10.1016/j.foodres.2012.11.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996912004735>
- [30] PEDERSEN, H. L. Juice quality and yield capacity of black currant cultivars in Denmark. *Acta horticulturae* [online]. 2008, roč. 2008, č. 777, 511-516s [cit. 2015-03-18]. Dostupné z: http://www.actahort.org/members/showpdf?booknrarnr=777_78
- [31] DEL RIO, D., G. BORGES a A. CROZIER. Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *British Journal of Nutrition* [online]. 2010, vol. 104, S3, S67-S90 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1017/S0007114510003958. Dostupné z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114510003958
- [32] SLIMESTAD, R. a H. SOLHEIM. Anthocyanins from Black Currants (*Ribes nigrum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2002, vol. 50, issue 11, s. 3228-3231 [cit. 2015-04-21]. DOI: 10.1021/jf011581u. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf011581u>
- [33] CASTAÑEDA-OVANDO, A., L. PACHECO-HERNÁNDEZ, E. PÁEZ-HERNÁNDEZ, J. A. RODRÍGUEZ a C. A. GALÁN-VIDAL. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* [online]. 2009, vol. 113, issue 4, s. 859-871 [cit. 2015-04-25]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.09.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608010674>
- [34] GIUSTI, M. M., R. E. WROLSTAD. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2001 [cit. 2015-04-21]. DOI: 10.1002/0471142913.faf0102s00. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142913.faf0102s00>

- [35] MARKOVÁ, L. *Srovnání některých nových odrůd rybízů z hlediska vybraných obsahových látek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 76 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D..
- [36] WELCH, C., Q. WU a J. SIMON. Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization. *Current Analytical Chemistry* [online]. 2008-04-01, vol. 4, issue 2, s. 75-101 [cit. 2015-04-21]. DOI: 10.2174/157341108784587795. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article>
- [37] MANACH, C., A. SCALBERT, C. MORAND, C. RÉMÉSY a L. JIMÉNEZ. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition* [online]. 2004, 79.5, s. 727-747 [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: <http://ajcn.nutrition.org/content/79/5/727.full>
- [38] ANTTONEN, M. J. a R. O. KARJALAINEN. High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Black Currant (*Ribes nigrum* L.) Fruit Phenolics Grown either Conventionally or Organically. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2006, vol. 54, issue 20, s. 7530-7538 [cit. 2015-04-25]. DOI: 10.1021/jf0615350. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0615350>
- [39] MIKKONEN, T. P., K. R. MÄÄTTÄ, A. T. HUKKANEN, H. I. KOKKO, A. R. TÖRRÖNEN, S. O. KÄRENLAMPI a R. O. KARJALAINEN. Flavonol Content Varies among Black Currant Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2001, vol. 49, issue 7, s. 3274-3277 [cit. 2015-04-21]. DOI: 10.1021/jf0010228. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0010228>
- [40] KOLEČKÁŘ, V., Z. ŘEHÁKOVÁ, E. BROJEROVÁ, K. KUČA, D. JUN, K. MACÁKOVÁ, L. OPLETAL a P. DRAŠAR. Proanthocyanidiny a jejich antioxidační aktivita. *Chemické listy* [online]. Praha: Česká společnost chemická, 2012, č. 106, s. 113-121 [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_02_113-121.pdf
- [41] JEON, S-M., H. K. KIM, H-J. KIM, G-M. DO, T-S. JEONG, Y. B. PARK a M-S. CHOI. Hypocholesterolemic and antioxidative effects of naringenin and its two metabolites in high-cholesterol fed rats. *Translational Research* [online]. 2007, vol. 149, issue 1, s. 15-21 [cit. 2015-04-21]. DOI: 10.1016/j.trsl.2006.08.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931524406003367>
- [42] JUNG, U.J, H.J KIM, J.S LEE, M.K LEE, H.O KIM, E.J PARK, H.K KIM, T.S JEONG a M.S CHOI. Naringin supplementation lowers plasma lipids and enhances erythrocyte antioxidant enzyme activities in hypercholesterolemic subjects. *Clinical Nutrition* [online]. 2003, vol. 22, issue 6, s. 561-568 [cit. 2015-04-25]. DOI: 10.1016/S0261-5614(03)00059-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261561403000591>
- [43] JUNG, U. J., M-K. LEE, Y. B. PARK, M. A. KANG a M-S. CHOI. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *The International Journal of Biochemistry*. 2006, vol. 38, issue 7, s. 1134-1145. DOI: 10.1016/j.biocel.2005.12.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272505004103>

- [44] ESPÍN, J. C., M. T. GARCÍA-CONESA, F. A. TOMÁS-BARBERÁN, M.K LEE, H.O KIM, E.J PARK, H.K KIM, T.S JEONG a M.S CHOI. Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*. 2007, vol. 68, 22-24, s. 2986-3008. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.09.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942207005717>
- [45] SIROTKIN, A. V. a A. H. HARRATH. Phytoestrogens and their effects. *European Journal of Pharmacology*. 2014, vol. 741, č. 99, s. 230-236. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.07.057. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299914006086>
- [46] AL-AZZAWI, F. a M. WAHAB. Effectiveness of phytoestrogens in climacteric medicine. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010, vol. 1205, issue 1, s. 262-267. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05678.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2010.05678.x>
- [47] HARMATHA, J. Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných rostlinných fenylypropanoidů. *Chemické listy*. 2005, č. 99, 622 - 632. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_09_622-632.pdf
- [48] BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews* [online]. 1998, vol. 56, issue 11, s. 317-333 [cit. 2015-04-25]. DOI: 10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x. Dostupné z: <http://nutritionreviews.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
- [49] CHRZAŚCIK, I. Analysis of Biologically Active Stilbene Derivatives. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* [online]. 2009-05-11, vol. 39, issue 2, s. 70-80 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1080/15389580802570184. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15389580802570184>
- [50] KOLOUCHOVÁ, I., K. MELZACH, V. FILIP a J. ŠMIDRKAL. Obsah resveratrolu v zelenině a ovoci. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2005, č. 99. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_07_492-495.pdf
- [51] VAN DER SLUIS, A. A., M. DEKKER, A. DE JAGER a W. M. F. JONGEN. Activity and Concentration of Polyphenolic Antioxidants in Apple: Effect of Cultivar, Harvest Year, and Storage Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2001, vol. 49, issue 8, s. 3606-3613 [cit. 2015-04-21]. DOI: 10.1021/jf001493u. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf001493u>
- [52] CROZIER, A., M. E. J. LEAN, M. S. MCDONALD a C. BLACK. Quantitative Analysis of the Flavonoid Content of Commercial Tomatoes, Onions, Lettuce, and Celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1997, vol. 45, issue 3, s. 590-595 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1021/jf960339y. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf960339y>
- [53] STRATIL, P., B. KLEJDUS a V. KUBÁŇ. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta* [online]. 2007-03-15, vol. 71, issue 4, s. 1741-1751 [cit. 2015-04-25]. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.08.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914006005741>

- [54] AGBOR, G., J. VINSON a DONNELLY. Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *International journal of food science, nutrition and dietetics* [online]. 2014 [cit. 2015-04-26]. Dostupné z: http://www.researchgate.net/publication/268811626_Folin-Ciocalteu_Reagent_for_Polyphenolic_Assay
- [55] STRATIL, P., B. KLEJDUS a V. KUBÁŇ. Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Vegetables Evaluation of Spectrophotometric Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2006, vol. 54, issue 3, s. 607-616 [cit. 2015-04-25]. DOI: 10.1021/jf052334j. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf052334>
- [56] SINGLETON, V. L., R. ORTHOFER a R. M. LAMUELA-RAVENTÓS. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* [online]. 1999, vol. 299, s. 152-178 [cit. 2015-04-25]. DOI: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687999990171>
- [57] STRATIL, P., V. KUBÁŇ a J. FOJTOVA. Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. Czech Journal of Food Sciences, 2008, roč. 26, č. 4, s. 242-253 [cit. 2015-01-25]. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/01961.pdf>
- [58] SCHOONEN, J. W. a G. M. SALES. Determination of polyphenols in wines by reaction with 4-aminoantipyrine and photometric flow-injection analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2002, vol. 372, 7-8, s. 822-828 [cit. 2015-04-25]. DOI: 10.1007/s00216-002-1267-1. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-002-1267-1>
- [59] LEE, G., M. V. ROSSI, N. COICHEV a H. D. MOYA. The reduction of Cu(II)/neocuproine complexes by some polyphenols: Total polyphenols determination in wine samples. *Food Chemistry* [online]. 2011, vol. 126, issue 2, s. 679-686 [cit. 2015-04-25]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.11.020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610014275>
- [60] NAKAMURA, T., N. COICHEV a H. D. MOYA. Modified CUPRAC spectrophotometric quantification of total polyphenol content in beer samples using Cu(II)/neocuproine complexes. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2012, vol. 28, issue 2, s. 126-134 [cit. 2015-04-25]. DOI: 10.1016/j.jfca.2012.07.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157512001470>
- [61] DVOŘÁKOVÁ, M., P. DOSTÁLEK a P. HULÍN. Analytické metody stanovení polyfenolů ve sladinách, mladínách a pivech. *Kvasný průmysl* [online]. 2006, roč. 52, č. 4, s. 111-114 [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: <http://www.kvasnyprumysl.cz/cz/journal/2006/4/>
- [62] FRANQUET-GRIELL, H., A. CHECA, O. NÚÑEZ, J. SAURINA, S. HERNÁNDEZ-CASSOU a L. PUIGNOU. Determination of Polyphenols in Spanish Wines by Capillary Zone Electrophoresis. Application to Wine Characterization by Using Chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2012-08-29, vol.

- 60, issue 34, s. 8340-8349 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1021/jf302078j. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf302078j>
- [63] NOLLET, E. by Leo M.L. *Handbook of food analysis*. 2. ed, rev. and exp. New York: Marcel Dekker, 2004. ISBN 978-082-4750-398
- [64] DVOŘÁKOVÁ, M., P. DOSTÁLEK a P. HULÍN. Determination of Polyphenols in Beer by an Effective Method Based on Solid-Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. 2007, vol. 25, s. 182-188 [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/00311.pdf>
- [65] IQBAL, K., A. KHAN a M. M. A. K. KHATTAK. Biological Significance of Ascorbic Acid (Vitamin C) in Human Health - A Review. *Pakistan Journal of Nutrition* [online]. 2004-1-1, vol. 3, issue 1, s. 5-13 [cit. 2015-04-25]. DOI: 10.3923/pjn.2004.5.13. Dostupné z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=pjn.2004.5.13>
- [66] ARRIGONI, O. a M. C. DE TULLIO. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2002, vol. 1569, 1-3, s. 1-9 [cit. 2015-04-25]. DOI: 10.1016/S0304-4165(01)00235-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416501002355>
- [67] EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to food (ANS) . Scientific Opinion on Dietary Reference Values for vitamin C. *EFSA Journal*. 2013; 11(11):3418 [68 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2013.3418; Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3418.htm#>
- [68] HENRY, J. a C. CHAPMAN. *The nutrition handbook for food processors*. Repr. Cambridge: Woodhead Publ. [u.a.], 2005. ISBN 978-185-5734-647.
- [69] Předpis č. 4/2008 Sb.: Vyhláška, kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. In: *Sbírka zákonů ČR*. 2008. Dostupné z: <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2008-4/info>
- [70] PAPPENBERGER, G. a H. P. HOHMANN. Industrial Production of l-Ascorbic Acid (Vitamin C) and d-Isoascorbic Acid. *Biotechnology of Food and Feed Additives* [online]. 2013, s. 143-188 [cit. 2015-04-21]. DOI: 10.1007/10_2013_243. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/10_2013_243
- [71] NOVÁKOVÁ, L., P. SOLICH a D. SOLICHOVÁ. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2008, vol. 27, issue 10, s. 942-958 [cit. 2015-04-25]. DOI: 10.1016/j.trac.2008.08.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993608001805>
- [72] ARYA, S. P., M. MAHAJAN a P. JAIN. Non-spectrophotometric methods for the determination of Vitamin C. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2000, vol. 417, issue 1, s. 1-14 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)00909-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267000009090>
- [73] SERPEN, A., V. GÖKMEN, K. S. BAHÇECİ a J. ACAR. Reversible degradation kinetics of vitamin C in peas during frozen storage. *European Food Research and Technology* [online]. 2007-3-5, vol. 224, issue 6, s. 749-753 [cit. 2015-04-25]. DOI:

- 10.1007/s00217-006-0369-y. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-006-0369-y>
- [74] NOLLET, L. M. *Food analysis by HPLC*. 2nd ed., rev. and exp. New York: Marcel Dekker, 2000, ix, 1049 p. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 100. ISBN 08-247-8460-X
- [75] KHAN, M. M. R., M.M. RAHMAN, M.S. ISLAM a S.A. BEGUM. A Simple UV-spectrophotometric Method for the Determination of Vitamin C Content in Various Fruits and Vegetables at Sylhet Area in Bangladesh. *Journal of Biological Sciences* [online]. 2006-2-1, vol. 6, issue 2, s. 388-392 [cit. 2015-04-25]. DOI: 10.3923/jbs.2006.388.392. Dostupné z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=jbs.2006.388.392>
- [76] DONG, M. *Modern HPLC for practicing scientists*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2006, xvi, 286 p. ISBN 04-717-2789-X
- [77] Základní charakteristiky chromatografického procesu. DOUŠA, M. *HPLC.CZ* [online]. 2013 [cit. 2015-04-21]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [78] ČSN EN 14130: *Potraviny - Stanovení vitamínu C metodou HPLC*. Český normalizační institut, 2004.

7 SEZNAM ZKRATEK

AA	askorbová kyselina
AAPM	metoda s použitím aminoantipyrinu
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
ATE	ekvivalent alfa tokoferolu
CGC	kapilární plynová chromatografie
CUPRAC	metoda redukce mědi
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor s diodovým polem
DCIP	2,6-dichlorfenolindofenol
DDD	doporučená denní dávka
DHAA	kyselina dehydroaskorbová
ED	elektrochemický detektor
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
ESI	ionizace elektrosprejem
FAD	flavinadenindinukleotid
FCM	metoda dle Folin-Ciocalteua
FD	fluorimetrický detektor
FMN	flavinmononukleotid
FL	fenolické látky
GAE	ekvivalent kyseliny gallové
GIT	gastrointestinální trakt
HILIC	kapalinová chromatografie s hydrofilní interakcí
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matice
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie (detektor)
NPK	hnojivo obsahující dusík, fosfor a draslík
ODS	oktadecylově modifikovaný silikagel
PBM	metoda Price a Butlera
PC	papírová chromatografie
PS/DVB	polystyren/divinilbenzen
RE	ekvivalent retinolu
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází
UV	ultrafialová oblast
UV/VIS	ultrafialová/viditelná oblast
TLC	tenkovrstvá kapalinová chromatografie
TOF	průletový detektor
VSUO	Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský

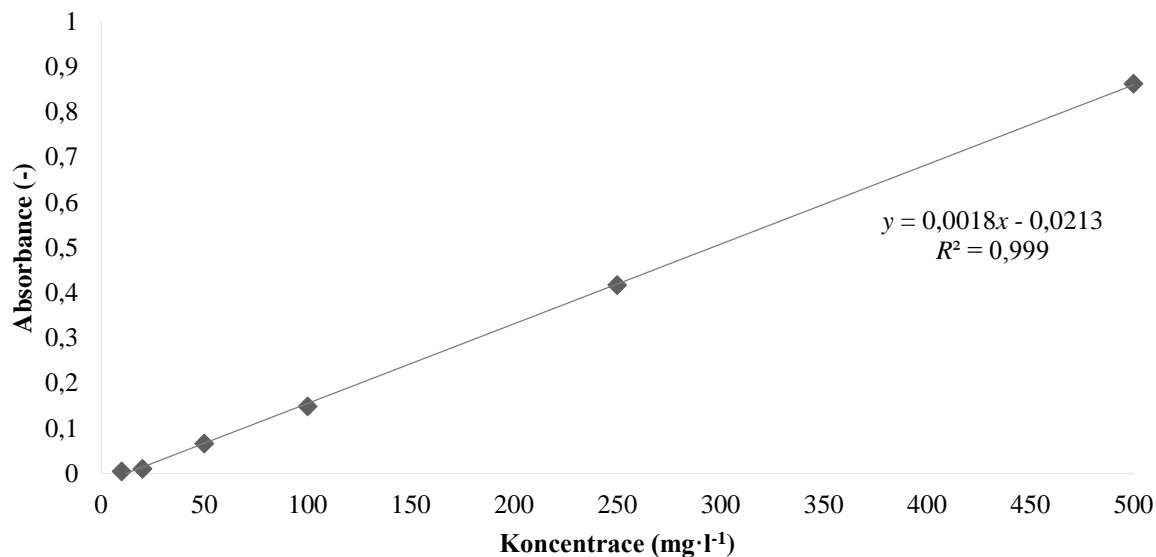
8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Kalibrační křivka kyseliny kalové	74
Příloha 2: Kalibrační křivky kyseliny askorbové	74
Příloha 3: Ukázka chromatogramu	75

9 PŘÍLOHY

9.1 Příloha 1: Kalibrační křivka kyseliny kalové

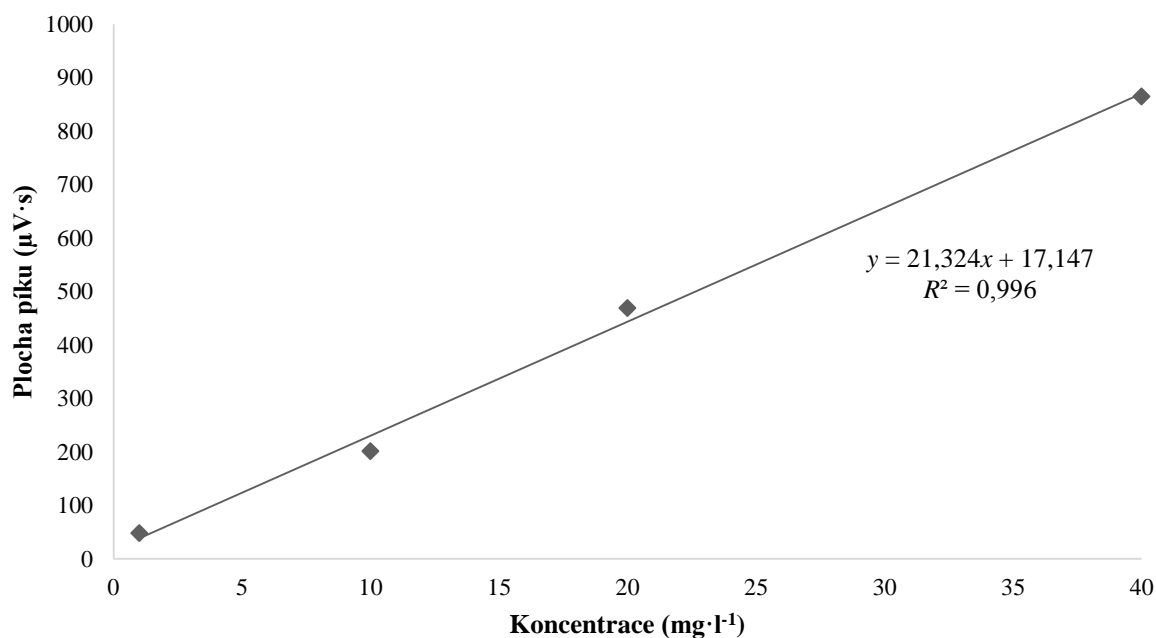
Kalibrační křivka kyseliny gallové



Graf 10: Kalibrační křivka kyseliny gallové

9.2 Příloha 2: Kalibrační křivky kyseliny askorbové

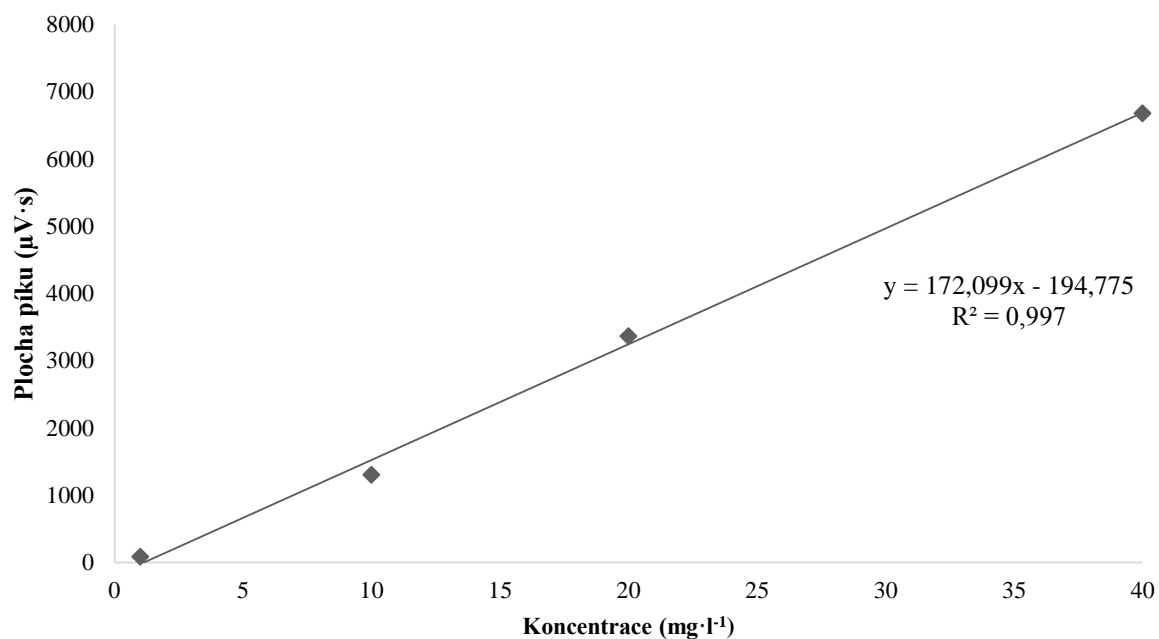
Kalibrační křivka kyseliny askorbové *



Graf 11: Kalibrační křivka kyseliny askorbové s použitím jiné průtočné cely

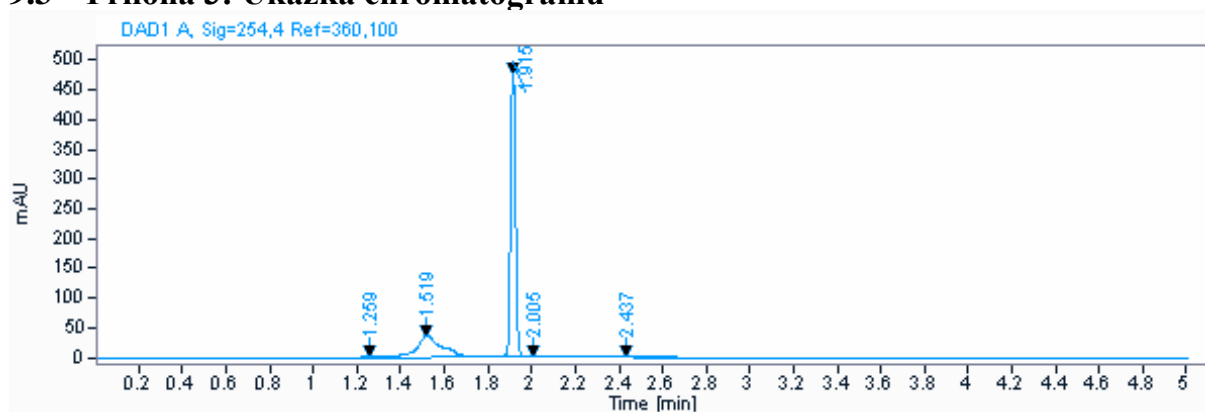
* byla použita jiná průtočná cela, viz 3.4.3

Kalibrační křivka kyseliny askorbové



Graf 12: Kalibrační křivka kyseliny askorbové

9.3 Příloha 3: Ukázka chromatogramu



Obrázek 17: Ukázka chromatogramu odrůdy Ceres tvarové modifikace V z VSUO (první nástřik)